

# EXPRESSION DES ACTIVATOR OF CREM IN TESTIS (ACT) BEI NORMALER UND GESTÖRTER SPERMATOGENESE VERSCHIEDENER SPEZIES



## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**INGRID BEßMANN**

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. K. Steger

---

**EXPRESSION DES ACTIVATOR OF CREM IN TESTIS (ACT)  
BEI NORMALER UND GESTÖRTER SPERMATOGENESE  
VERSCHIEDENER SPEZIES**

**INAUGURAL DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Ingrid Beßmann**

Tierärztin aus Heilbronn

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. K. Steger

PD Dr. G. Schuler

Tag der Disputation: 30. März 2006



*Für  
meine Eltern,  
die immer für mich da sind,  
meinen Onkel Hans,  
der mir eine große Hilfe war,  
und Kai*



# INHALT

1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1	Histologische Grundlagen der Spermatogenese	4
2.1.1	Definition der Spermatogenese	4
2.1.2	Anatomie des Hodens	4
2.1.3	Histologie des Hodens	5
2.1.3.1	Interstitium	5
2.1.3.2	Tubuli seminiferi	6
2.1.4	Stadien und Kinetik der Spermatogenese	10
2.1.4.1	Spermatogenesezyklus	10
2.1.4.2	Keimepithelzyklus	11
2.2	Regulationsmechanismen der Spermatogenese	14
2.2.1	Endokrine Regulation	14
2.2.2	Genetische Regulation	15
2.2.2.1	Sequentielle Expression von Nukleoproteinen im Verlauf der Spermatogenese	15
2.2.2.2	Überblick über verschiedene Regulationsmöglichkeiten der Genexpression	19
2.2.2.3	Die Transkriptionsfaktoren CREM und CREB als zentrale Regulatoren der Spermatogenese	25
2.2.2.3.1	Physiologische Funktionen von CREM und CREB	25

2.2.2.3.2	Bau des CREM-Gens und CREM-Isoformen	26
2.2.2.3.3	Aktivierung und Modulierung von CREM	29
2.3	Störungen der Spermatogenese	33
2.3.1	Diagnose und Ätiologie	33
2.3.2	Störungen der endokrinen Regulationsmechanismen	34
2.3.3	Störungen der genetischen Regulationsmechanismen	35
2.3.3.1	Störungen der sequentiellen Expression von Kernproteinen in haploiden Spermatiden	35
2.3.3.2	Störungen der transkriptionalen und translationalen Regulation	36
3.	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	Untersuchungsmaterial, Geräte, Chemikalien	38
3.1.1	Hodengewebe	38
3.1.1.1	Menschliches Hodengewebe	38
3.1.1.2	Hodengewebe vom Java-Affen	38
3.1.1.3	Hodengewebe von der Maus	38
3.1.1.4	Hodengewebe vom Pferd	39
3.1.1.5	Aufbereitung des Hodengewebes	39
3.1.2	Geräte	40
3.1.3	Chemikalien	40
3.1.3.1	Gesamt-RNA-Extraktion	40
3.1.3.2	Reverse Transkription	40
3.1.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41

3.1.3.4	Herstellung DIG-markierter cRNA-Sonden	41
3.1.3.5	<i>In-situ</i> Hybridisierung	41
3.1.3.6	Agarosegel-Elektrophoresen	43
3.2	Untersuchungsmethoden	44
3.2.1	Gesamt-RNA-Extraktion aus Kryo-Material	45
3.2.2	Reverse Transkription	47
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
3.2.4	Herstellung DIG-markierter cRNA-Sonden	52
3.2.4.1	Restriktionsendonuclease-Verdauung	54
3.2.4.2	<i>In-vitro</i> Transkription	55
3.2.5	<i>In-situ</i> Hybridisierung	56
3.2.6	Agarosegel-Elektrophoresen	61
4.	ERGEBNISSE	64
4.1	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	65
4.1.1	Normale Spermatogenese	66
4.1.2	Spermatogenese-arrest	66
4.2	<i>In-situ</i> Hybridisierung (ISH)	68
4.2.1	Normale Spermatogenese	69
4.2.2	Spermatogenese-arrest	70
4.3	Vergleich der ACT-Expressionsmuster der untersuchten Spezies	78
4.3.1	Normale Spermatogenese	78

4.3.2	Spermatogenese-arrest	78
5.	DISKUSSION	80
5.1	ACT – Expression und Lokalisation	80
5.1.1	ACT bei normaler Spermatogenese	80
5.1.1.1	ACT-Expression beim Menschen	81
5.1.1.2	ACT-Expression bei der Maus	82
5.1.1.3	ACT-Expression bei <i>Macaca fascicularis</i>	83
5.1.1.4	ACT-Expression beim Pferd	83
5.1.2	ACT bei gestörter Spermatogenese	84
5.1.2.1	ACT-Expression beim Menschen mit Spermatogenesestörung	85
5.1.2.2	ACT-Expression bei der CREM knock-out Maus	87
5.2	Das ACT-Protein – Sequenz und Struktur	88
5.3	Interaktionen von ACT mit CREM	92
5.4	Vergleich von ACT mit anderen FHL-Proteinen	94
5.4.1	Struktur und Sequenz – FHL 1-4 und ACT	94
5.4.2	Expressionsmuster	95
5.4.3	Transaktivierungskapazität	96
5.4.4	Interaktion mit CREM und CREB	96

6.	ZUSAMMENFASSUNG	98
7.	SUMMARY	99
8.	LITERATURVERZEICHNIS	101
9.	ANHANG	117

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

DANKSAGUNG





# 1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

## 1.1 Einleitung

Von Unfruchtbarkeit, Sterilität oder Infertilität spricht man, wenn bei einem Paar innerhalb von einem Jahr trotz Kinderwunsches und regelmäßigen ungeschützten Geschlechtsverkehrs keine Schwangerschaft eintritt. Nach einer Mitteilung von Medicine-Worldwide vom 22. April 2004 ([www.onmeda.de](http://www.onmeda.de)) sind in Deutschland ca. 15% der Paare ungewollt kinderlos, wobei die Ursache in 30-40% der Fälle beim Mann, in 30-40% der Fälle bei der Frau und in 15-30% der Fälle bei beiden Partnern liegt. Bei 5-15% der Paare ist keine organische Ursache nachweisbar. Laut einer Schätzung der WHO ([www.who.int.de](http://www.who.int.de)) sind weltweit ca. 7% aller Männer unfruchtbar. Es gibt Hinweise (*Jensen et al., 2002*), daß Fertilitätsstörungen beim Mann in den vergangenen 10-15 Jahren deutlich zugenommen haben. Entsprechend werden in den nächsten Jahren auch die Anforderungen an Diagnostik und Therapie der männlichen Infertilität steigen.

Männliche Infertilität kann viele Ursachen haben, in den meisten Fällen liegt jedoch eine Störung der Spermatogenese vor. Spermatogenesestörungen führen unabhängig von ihrer Ursache stets zu einer quantitativ und qualitativ verminderten Spermienproduktion bzw. zu Azoospermie (*Steger, 2001a*). Die Diagnose erfolgt durch eine zytologische Ejakulatanalyse. Der häufigste Befund ist die Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom), die durch eine Samenzelldichte von  $< 20$  Mio/ml (Oligozoospermie), einen Anteil beweglicher Samenzellen von  $< 50\%$  (Asthenozoospermie) und einen Anteil normal geformter Samenzellen von  $< 30\%$  (Teratozoospermie) definiert ist (*WHO, 1993*). Histologisch zeigen Männer mit OAT-Syndrom das Bild einer bunten Atrophie, d.h. innerhalb eines Schnittes können in benachbarten Tubuli seminiferi gleichzeitig qualitativ normale Spermatogenese, Spermatogeneseearreste auf der Stufe von runden Spermatiden, Spermatozyten oder Spermatogonien und Germinalzellaplasie nachgewiesen werden (*Sigg, 1979*).

Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden konnten bereits einige grundlegende Mechanismen, die für die Entwicklung von Spermatogonien zu befruchtungsfähigen Spermien notwendig sind, geklärt werden. Es ist inzwischen bekannt, daß der genetischen Regulation der Spermatogenese neben endokrinen Kontrollmechanismen eine entscheidende Bedeutung bei der

Keimzellentwicklung zukommt. So bildet die zeitlich und stadienspezifisch streng koordinierte und kontrollierte Genexpression von Kernproteinen für die Differenzierung runder Spermatiden in befruchtungsfähige Spermien eine grundlegende Voraussetzung (*Steger, 1999a, 2001b*). Für die Regulation des Histon-Protamin-Austauschs in haploiden Spermatiden (ausführliche Darstellung in Kapitel 2.2.2.1) scheint der Transkriptionsfaktor cAMP-responsive element modulator (CREM) eine zentrale Rolle zu spielen (*Blendy et al., 1996, Nantel et al., 1996*). CREM aktiviert seine Zielgene, indem es an das cAMP-responsive element (CRE) bindet, das u.a. im Promotor der Protamingene, aber auch im Promotor vieler anderer postmeiotisch exprimierter Gene nachweisbar ist (*Johnson et al., 1988, Heideran et al., 1989, Oliva und Dixon, 1991, Kistler et al., 1994*). Die Aktivierung von CREM erfolgt durch Interaktion von bislang noch nicht identifizierten Liganden mit Zelloberflächenrezeptoren, welche, vermittelt über den Adenylatzyklase-Signaltransduktionsweg, schließlich zu einer Phosphorylierung von CREM führen (*Lalli et al., 1996, Walker und Habener, 1996, Sassone-Corsi, 1998*).

Im Gegensatz zu diesem in somatischen Zellen beschrittenen Weg der Modulation von CREM durch Phosphorylierung konnten *Fimia et al. (1999)* und *De Cesare et al. (2000)* in Keimzellen eine phosphorylierungsunabhängige Aktivierung von CREM durch den hodenspezifischen Activator of CREM in testis (ACT) nachweisen. So wurde gezeigt, daß bei normaler Spermatogenese des Menschen und der Maus ACT und CREM im Keimepithel koexprimiert werden und ACT als nukleäres Protein stadienspezifisch in runden und elongierten Spermatiden vorkommt. Diese sowie eine weitere Studie (*Palermo et al., 2001*) basieren jedoch auf Nachweisverfahren (u.a. Northern Blot Technik), die keine exakte zellspezifische Lokalisation von ACT erlauben. Bislang liegen keine Studien über eventuelle Veränderungen der ACT-Expression bei Spermatogenesestörungen vor. Bei *Macaca fascicularis*, der als Modellsystem für die Spermatogenese des Menschen dient (*Weinbauer und Nieschlag, 1999*), und beim Hengst, bei dem die Subfertilitätsproblematik besonders im Rahmen der Zucht von großer Bedeutung ist (*Parlevliet, 1998, Varner et al., 2000*), wurde ACT bislang nicht nachgewiesen.

## 1.2 Zielsetzung

In der vorliegenden Studie soll die Genexpression und die Lokalisation der ACT-Transkripte bei vier ausgewählten Spezies und unter Anwendung zweier verschiedener Nachweismethoden untersucht werden. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob Spermatogenesestörungen mit einer Veränderung der Genexpression bzw. der Lokalisation von ACT assoziiert sind.

Als Nachweismethoden dienen Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und *in-situ* Hybridisierung (ISH). Durch die Kombination beider Verfahren ist eine exakte zell- und stadienspezifische Zuordnung der ACT-mRNA gewährleistet.

Die gewählten Spezies umfassen Mensch (normale Spermatogenese und Spermatidenarrest), Maus (normale Spermatogenese und CREM knock-out Maus), *Macaca fascicularis* (normale Spermatogenese) und Pferd (normale Spermatogenese).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen die Rolle von ACT als Koaktivator des Transkriptionsfaktors CREM bei der Regulation der Genexpression in haploiden Spermatiden näher beleuchten. Eine Verbesserung der (In)Fertilitätsdiagnostik ist dringend notwendig, sowohl beim Menschen im Rahmen der assistierten Reproduktion als auch beim Pferd im Hinblick auf die Pferdezucht. Beim Pferd beschränken sich die Therapiemöglichkeiten zur Zeit auf die endokrine Ebene (*Douglas und Umphenour, 1992, Brinsko, 1996*). Über die genetischen Regulationsvorgänge ist noch sehr wenig bekannt (*Blöcher et al., 2003*). In Analogie zum Menschen sind jedoch auch beim Pferd wichtige Erkenntnisse über regulationsbedingte Spermatogenesedefekte und Infertilität zu erwarten.

## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Histologische Grundlagen der Spermatogenese**

#### **2.1.1 Definition der Spermatogenese**

Unter Spermatogenese versteht man die Differenzierungs- und Reifungsvorgänge, die sich während der Entwicklung männlicher Keimzellen in den Samenkanälchen abspielen und die nach Abgabe der reifen Spermatozoen in das Lumen der Hodenkanälchen die Bildung befruchtungsfähiger Spermien im Nebenhoden zum Ziel haben.

#### **2.1.2 Anatomie des Hodens**

Der Hoden ist paarig angelegt und dient der Bildung der Samenzellen sowie der Synthese männlicher Geschlechtshormone. Er wird von mehreren Hodenhüllen umgeben (von außen nach innen):

- Skrotalhaut
- Tunica dartos
- Fascia spermatica externa
- M. cremaster
- Fascia spermatica interna
- Tunica vaginalis testis bestehend aus Lamina parietalis (Periorchium) und Lamina visceralis (Epiorchium)

Die Tunica albuginea liegt als derbe bindegewebige Kapsel dem Hodenparenchym direkt auf. Von ihr strahlen radiäre Bindegewebssepten, Septula testis, in das Hodeninnere ein und bilden je nach Spezies zentral (Pferd) oder marginal (Mensch, Primaten) das Mediastinum testis.

Die Septula testis trennen das Hodenparenchym in zahlreiche pyramidenförmige Hodenläppchen, Lobuli testis, die jeweils zwei bis fünf samenbereitende gewundene Samenkanälchen, Tubuli seminiferi contorti, einschließen. Diese sind umgeben von Bindegewebe, Gefäß- und Nervenplexus und strecken sich vor dem Übergang in das bindegewebige Mediastinum zu kurzen geraden Abschnitten, Tubuli seminiferi recti.

Im Mediastinum bilden die Tubuli seminiferi das Hodennetz, Rete testis, von dem aus über die Ductuli efferentes testis eine Verbindung zum Nebenhoden entsteht (siehe Abb.1).

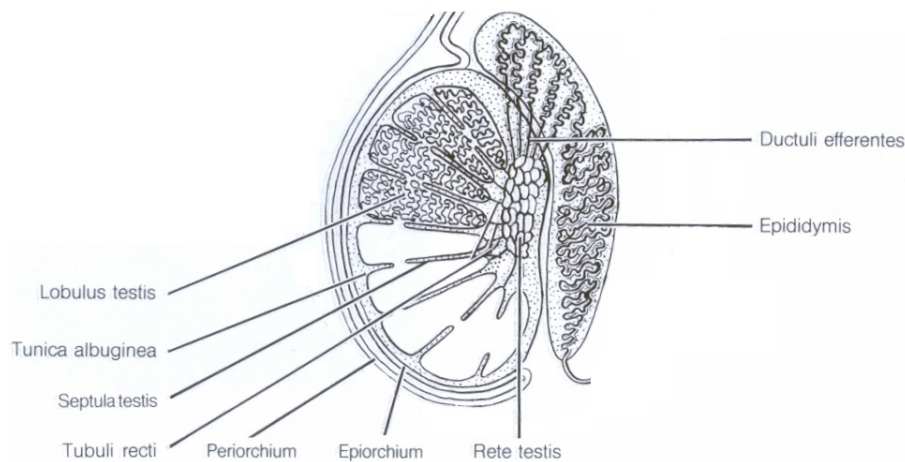


Abb.1 Anatomie des menschlichen Hodens.

### 2.1.3 Histologie des Hodens

Die beiden Hauptfunktionen des adulten Hodens, Bildung befruchtungsfähiger Spermien und Synthese von Geschlechtshormonen, erfolgen an zwei morphologisch und funktionell separaten Orten innerhalb der Lobuli testis (vgl. Abb.2):

- im Interstitium werden durch die Leydig-Zellen Sexualsteroid synthetisiert
- in den Tubuli seminiferi contorti findet die Bildung der männlichen Samenzellen statt

#### 2.1.3.1 Interstitium

Das intertubuläre Kompartiment beherbergt Bindegewebe, kleinere Blut- und Lymphgefäße, Nerven und die endokrinen Leydig-Zellen.

Leydig-Zellen (Zwischenzellen) sind isoliert, in Gruppen oder strangförmig in das umgebende Bindegewebe eingelagert. Sie sind azidophil, unregelmäßig polygonal mit euchromatinreichem oft exzentrisch liegendem Zellkern mit deutlichem Nukleolus. Das helle Zytoplasma beinhaltet große Mitochondrien und ein deutliches glattes endoplasmatisches Retikulum (gER). Unter der endogenen Stimulation durch das luteinisierende Hormon (LH)

der Hypophyse werden die Leydig-Zellen zur Synthese von Androgenen (Testosteron) angeregt.

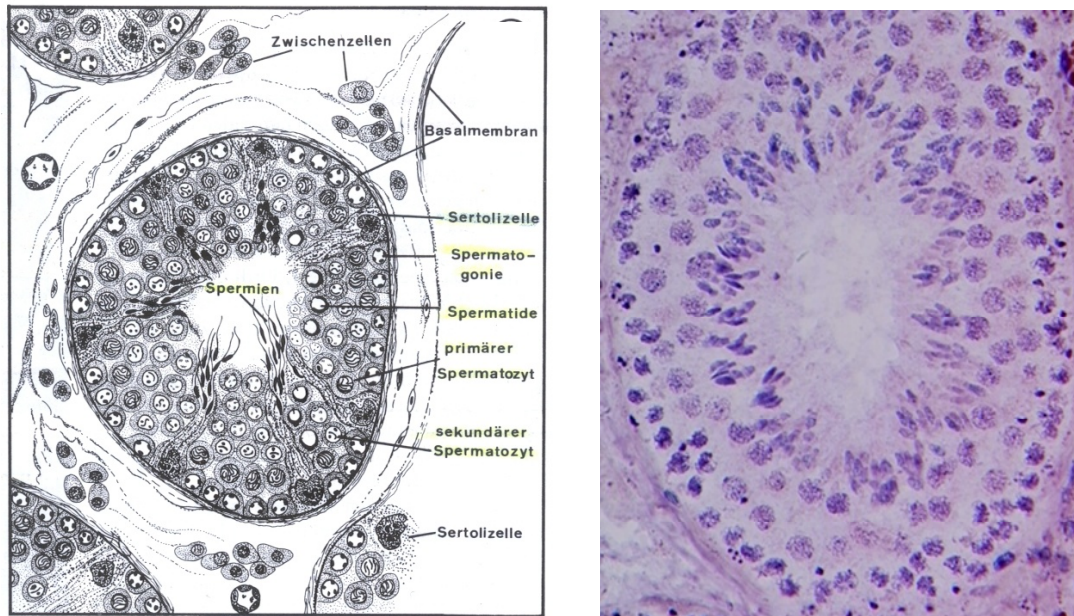


Abb.2 Querschnitt eines Samenkanälchens, Schema und HE-Präparat (Pferd).

### 2.1.3.2 Tubuli seminiferi

Die Tubuli seminiferi enthalten somatische Sertoli-Zellen und verschiedene Keimzellpopulationen, die zusammen das ca. 50-90  $\mu\text{m}$  hohe Keimepithel (Epithelium spermatogenicum) bilden, in welchem die Spermatogenese stattfindet. Die Membrana propria stellt die äußere Umhüllung für das Keimepithel dar.

- Membrana propria (Lamina limitans)

Die Membrana propria besteht aus einer innen gelegenen Basallamina, welche sich bis zwischen die darüber liegenden Sertoli-Zellen und Spermatogonien vorwölben kann, einer mittleren Schicht aus peritubulären Zellen, die für die peristaltischen Kontraktionswellen der Tubuli verantwortlich sind, und einer äußeren Lage aus kollagenen und elastischen Fasern sowie flachen Fibrozyten.



- Sertoli-Zellen

Die Sertoli-Zellen im Keimepithel sind somatische hochprismatische postmitotische Zellen von 50-80 µm Höhe, die mit einer breiten Basis der Basalmembran aufsitzen und sich lumenwärts pyramidenförmig verjüngen. Der basal liegende ovale bis elliptische oft gelappte Zellkern ist chromatinarm. Das Zytoplasma umschließt mit zahlreichen dünnen verzweigten Lateralfortsätzen die Keimzellpopulationen und ist aktiv an deren transepithelialer Wanderung und Abgabe ins Tubuluslumen (Spermiation) beteiligt. Die Sertoli-Zellen stehen mit den Keimzellen über besondere Zellverbindungen strukturell und funktionell in Kontakt. Untereinander sind sie über „Sertoli-Sertoli-junctional-complexes“ bestehend aus adhaerens, gap und tight junctions verbunden, welche das morphologische Äquivalent der Blut-Hoden-Schranke darstellen und dadurch ein basales (mit Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten) und ein adluminales (mit Spermatozyten und Spermatisiden) Kompartiment entstehen lassen (*Pelletier und Friend, 1983*).

Weitere Aufgaben sind Schutz-, Stütz- und Ernährungsfunktion für die Samenzellen, Phagozytoseaktivität sowie Sekretion verschiedener Proteine (u.a. androgenbindendes Protein (ABP), Transferrin, Anti-Müller-Hormon und Inhibin) und intratubulärer Samenflüssigkeit (Schaffung eines speziellen intratubulären Milieus (*Bardin et al., 1988*)).

- Keimzellen

Die Vorstufen der Samenzellen wandern im Laufe ihrer Entwicklung im Keimepithel von der Basalmembran entlang der Oberfläche der Sertoli-Zellen in Richtung Lumen und differenzieren dabei im Rahmen der Spermatogenese von Spermatogonien zu morphologisch reifen aber noch nicht befruchtungsfähigen unbeweglichen Spermatozoen (vgl. Abb.3). Charakteristisch für Keimzellen ist, daß die aus der Teilung einer Spermatogonie hervorgehenden Tochterzellen während nahezu der gesamten Spermatogenese durch Zytoplasmabrücken verbunden bleiben (Bildung von Zellklonen).

Spermatogonien: Diese Stammzellen der Spermatogenese durchlaufen im Zuge der Spermatogoniogenese durch wiederholte mitotische Teilungen mehrere Entwicklungsstufen, die sich in erster Linie durch ihre Kernmorphologie unterscheiden, speziesspezifisch z.T. erheblich variieren und auch verschieden bezeichnet werden. Beim Menschen findet man folgende Differenzierungsstufen:

- ◆ A-Spermatogonien haben stets engen Kontakt zur Basalmembran und sind in allen Stadien des Keimepithelzyklus zu finden. Sie sind rund mit heterochromatinarmem ellipsoidem

Zellkern mit meist mehreren Nukleoli. Typisch ist die relativ homogene Verteilung des Chromatins im Zellkern, wobei  $A_{\text{pale}}$  ( $A_p$ ) Spermatogonien einen helleren,  $A_{\text{dark}}$  ( $A_d$ ) Spermatogonien einen dunkleren Nukleus mit hellem Fleck besitzen. Nach der mitotischen Teilung der Stammspermatogonie bleibt eine A-Spermatogonie als Stammzelle erhalten, die andere durchläuft mehrere Mitosen und differenziert dann zur B-Spermatogonie.

♦ B-Spermatogonien stehen nur noch selten in Verbindung zur Basalmembran, sie sind eher birnenförmig mit verdichtetem Chromatin (exzentrischer Zellkern). Sie teilen sich mitotisch und differenzieren zu primären Spermatozyten.

Bei Affe und Pferd unterscheidet man nur zwischen A- und B-Spermatogonien, die Differenzierung in  $A_{\text{pale}}$  und  $A_{\text{dark}}$  entfällt. Bei der Maus finden sich zwischen A- und B-Spermatogonien noch sogenannte I-Spermatogonien:

♦ I-Spermatogonien (Intermediär) haben einen kleineren und dichteren Kern und das Chromatin ist grobkörniger als bei A-Spermatogonien.

Primäre Spermatozyten: Sie entstehen durch Differenzierung aus B-Spermatogonien und durchlaufen nach einer kurzen präleptotänen Phase, in der sich der DNA-Gehalt verdoppelt, im Rahmen der ersten Reifeteilung (Meiose I) alle Stadien der meiotischen Prophase: Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese. Hierbei erfolgt innerhalb von ca. 20 Tagen (Mensch) die Chromosomenkonjugation des väterlichen und mütterlichen Erbguts. Die Folgestadien Meta-, Ana- und Telophase laufen schneller ab. Man findet primäre Spermatozyten aufgrund der langdauernden Prophase in allen Stadien des Keimepithelzyklus, wobei sie im Laufe ihrer Entwicklung eine starke Größenzunahme erfahren. Im Kern zeigen sich große Mengen geknäuelter Chromatinfäden (stadienspezifische Anordnung), ein großes Golgi-Feld, zahlreiche Mitochondrien und Zisternen aus rauhem endoplasmatischem Retikulum (rER). Der Chromosomensatz ist speziesspezifisch und diploid ( $2n$ ), der DNA-Gehalt  $4c$ .

Sekundäre Spermatozyten: Sie liegen näher am Tubuluslumen, sind deutlich kleiner als primäre Spermatozyten und weisen einen schwach anfärbbaren runden Zellkern auf. Sie besitzen einen haploiden Chromosomensatz ( $1n$ ) und einen auf die Hälfte reduzierten DNA-Gehalt ( $2c$ ). Da sich diese Keimzellen sofort nach ihrer Entstehung ohne vorherige DNA-Synthesephase erneut teilen (zweite Reifeteilung (Meiose II)), trifft man sie im histologischen Schnittbild des Keimepithelzyklus nur relativ selten an.

**Spermatiden:** Sie enthalten einen haploiden Chromosomensatz ( $1n$ ) und eine im Vergleich zur normalen Zelle auf ein Viertel reduzierte DNA-Menge ( $1c$ ). Während der Spermiogenese vollziehen sich an ihnen auffällige Umgestaltungsprozesse, wobei Kern, Zentriolen und Golgi-Apparat maßgeblich beteiligt sind.

Die kleinen Spermatiden, welche durch ihr dichtes Chromatin auffallen, liegen zu Beginn lumennah, wandern dann Richtung Basalmembran, um gegen Ende wieder das Tubuluslumen zu erreichen. Man differenziert runde und elongierte Spermatiden und unterscheidet im Einzelnen vier Phasen der Spermiogenese:

- ◆ **Golgi-Phase:** In der runden Spermatide entsteht durch Verschmelzung mehrerer proakrosomaler Granula ein einheitliches akrosomales Vesikel mit dichtem Granulum, welches die äußere Kernmembran berührt und sich langsam abflacht.
- ◆ **Kappenphase:** Das akrosomale Bläschen wird zur Akrosomenkappe unter welcher sich das Chromatin im Zellkern zu verdichten beginnt. Die Hauptmasse des Zytoplasmas samt Organellen verlagert sich nach distal des Kerns, die Spermatide nimmt eine ovale Form an.
- ◆ **Akrosomenphase:** Es tritt eine dorsoventrale Abflachung und Kondensation des Zellkerns ein, die Akrosomkappe entwickelt sich zum definitiven Akrosom mit Akrosomfortsatz, der hydrolytische Enzyme, Hyaluronidase, Neuraminidase und Akrosin enthält. Im postakrosomalen Kernbereich differenziert sich als temporäres Zytoskelett die Manschette aus Mikrotubuli, der Geißelapparat aus dem distalen Zentriol (späteres Flagellum) und, nahe des proximalen Zentriols, der Schlußring. Die Spermatide hat nun durch Streckung von Zellkern und Zelleib bereits elongierte Form.
- ◆ **Reifungsphase:** Die Kondensation des Kerns wird abgeschlossen, der Schlußring nach distal verlagert (Spermienhals); aus dem Geißelapparat entsteht der Achsenfaden aus 9 äußeren Doppeltubuli und einem zentralen Tubuluspaar ( $9 \times 2 + 2$ -Struktur), der proximal von Zytoplasmaresten und spiralig angeordneten Mitochondrien (Mittelstück) und distal von der Ringfaserscheide (Hauptstück) umgeben wird. Ein Großteil des Zytoplasmas wird als Restkörper abgeschnürt und von den Sertoli-Zellen phagozytiert.

**Spermatozoen:** Das morphologisch ausdifferenzierte aber noch nicht eigenständig befruchtungsfähige 60-75  $\mu\text{m}$  lange Spermatozoon geht als Endstadium aus der Spermiogenese hervor. Es setzt sich aus Kopf und Schwanz mit Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück zusammen. Sertoli-Zellen umfassen kappenähnlich die Köpfe, die Schwanzfäden ragen büschelartig ins Tubuluslumen vor.

Erst kurz vor der Abgabe der Spermatozoen ins Tubuluslumen (Spermiation) lösen sich die Zytoplasmabrücken zwischen den Mitgliedern eines Zellklons. Die vollständige Ausreifung zum befruchtungsfähigen Spermium erfolgt während der Passage durch den Nebenhoden.

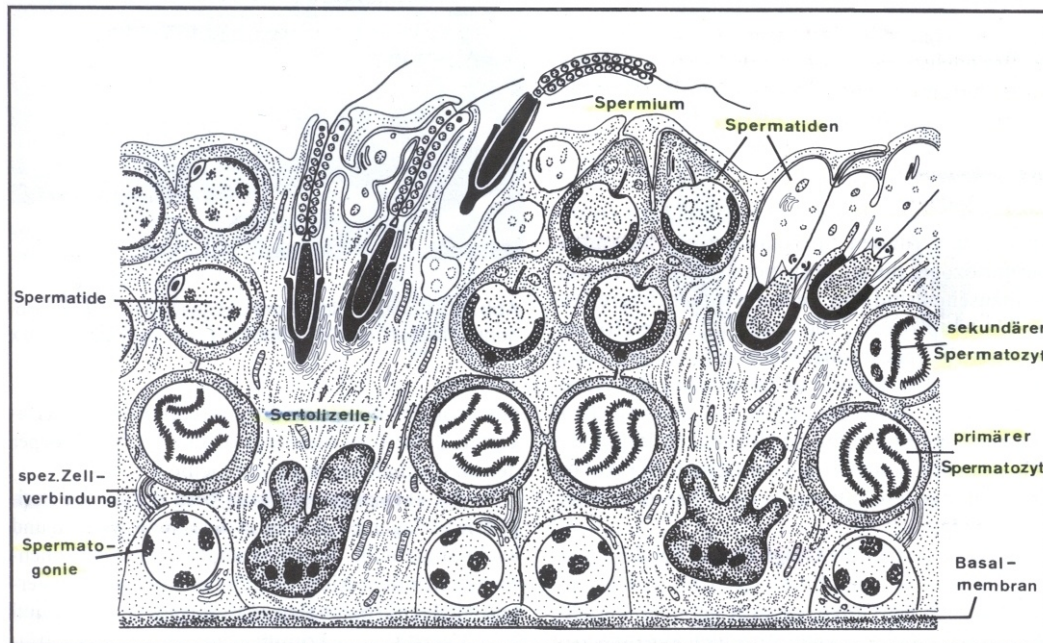


Abb.3 Ausschnitt aus dem Keimepithel, Schema.

## 2.1.4 Stadien und Kinetik der Spermatogenese

### 2.1.4.1 Spermatogenesezyklus

Man unterscheidet bei der Spermatogenese folgende drei Schritte:

Spermatogoniogenese, Meiose und Spermiogenese.

Zu Beginn der Spermatogoniogenese (mitotische Vermehrungsphase) teilen sich männliche Stammzellen (Spermatogonien) zunächst mitotisch in zwei Tochterzellen (A-Spermatogonien). Die Anzahl weiterer Spermatogonienteilungen ist speziesspezifisch unterschiedlich. Eine der A-Spermatogonien verbleibt als neue Stammzelle, die andere erfährt weitere mitotische Teilungen und entwickelt sich über das Stadium der B-Spermatogonie zur primären Spermatozyte (differentielle Zellteilung).

Letztere durchläuft nach einer kurzen Wachstumsphase innerhalb der meiotischen Vermehrungsphase zunächst die erste Reifeteilung (Reduktionsteilung, Meiose I), aus der dann zwei sekundäre Spermatozyten hervorgehen. Diese teilen sich alsbald in einer zweiten Reifeteilung (Äquationsteilung, Meiose II) erneut und bilden insgesamt vier Spermatiden.

Im Rahmen der anschließenden Spermiogenese (Differenzierungsphase) durchlaufen die Spermatiden keine weiteren Teilungen, sondern wandeln sich durch Zelldifferenzierung und komplexe morphologische, biochemische und physiologische Veränderungen in reife elongierte Spermatozoen um.

#### **2.1.4.2 Keimepithelzyklus**

Typisches Merkmal sowohl des Spermatogenese- als auch des wesentlich kürzeren Keimepithelzyklusses ist die strenge Regelung und zeitliche Synchronisation der Teilungs- und Umbildungsvorgänge.

Der Spermatogenesezyklus bezeichnet die Keimzellentwicklung von der mitotischen Teilung der Spermatogonien bis zur Spermiation (siehe 2.1.4.1).

Der Keimepithelzyklus dagegen beschreibt den vollständigen Ablauf einer Serie von typischen Zellbildern an einer bestimmten Stelle des Samenkanälchens bis zur nächsten identischen Zellgemeinschaft von Keimzellklonen (*Cole und Cupps, 1969*).

Als Phase oder Keimzellklon bezeichnet man die Abkömmlinge einer einzigen Stammspermatogonie, welche bis zur Spermiation über Interzellularbrücken miteinander verbunden sind (*de Kretser und Kerr, 1988*); im Gegensatz hierzu wird die Gemeinschaft aller im Tubulusquerschnitt erfaßten Populationen Stadium genannt. Aus Phasen bzw. Stadien gleichen Entwicklungsstandes wird im Tubulusverlauf schließlich ein Segment gebildet, welches durch synchrones Verhalten der Keimzellen gekennzeichnet ist. Die Gesamtheit aller Segmente faßt man als Spermatogenesewelle zusammen.

Zwischen den Entwicklungsstufen der verschiedenen Generationen bestehen gesetzmäßige Verbindungen, so daß im histologischen Schnitt morphologisch exakt definierbare Zustandsbilder mit charakteristischen Zellassoziationen entstehen (Stadien des Keimepithelzyklusses). Der Zyklus ist also aus zahlreichen Stadienbildern zusammengesetzt, deren Anzahl und morphologische Charakteristika unter den verschiedenen Spezies variieren (Vgl. Abb.20):

Beim Menschen wird der Keimepithelzyklus in sechs Stadien eingeteilt (*Clermont, 1963*), welche auf der unterschiedlichen Kernmorphologie der Spermatiden und der verschiedenen Anfärbbarkeit der Spermatidenkerne mit der Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Methode während der Spermiogenese beruht. Die Differenzierung runder in elongierte Spermatiden unterteilt man dabei in 8 Entwicklungsstufen (steps) (siehe auch Abb.4).

Bei der Maus unterscheidet man 12 Stadien (*Russell et al., 1990*) und 16 Spermatidenentwicklungsstufen, wobei man Spermatiden von step 1-8 als rund, von step 9-12 als elongierend und von step 13-16 als elongiert bezeichnet.

Für den Java-Affen entwickelten *Behr und Weinbauer (1999)* ein Schema, welches ähnlich dem der Maus auf 12 Stadien beruht und zwischen 14 Stufen der Spermatidenentwicklung differenziert. Auffällig ist eine hohe Anzahl von A- und B-Spermatogonien.

Der Keimepithelzyklus des Pferdes wurde von *Johnsen (1970)* in 8 Stadien eingeteilt. Die Spermatidenentwicklungsstufen unterteilte er in 12 Stufen.

Das steuernde Prinzip dieser zeitlichen Abstimmung bezeichnet man als Synchronisation der Spermatogenese. Es beginnen immer mehrere Stammspermatogonien gleichzeitig mit der Teilung. Die einzelnen Segmente des Keimepithelzyklus sind so angeordnet, daß einem bestimmten Segment immer das in der Entwicklung nächsthöhere folgt. Beim menschlichen Hoden sind an einem Tubulusquerschnitt meist zwei bis drei verschiedene Stadien des Keimepithelzyklus zu erkennen, während andere Spezies nur ein Stadium pro Tubulusquerschnitt zeigen.

Bei allen Spezies umfaßt die Spermatogenese zwischen 4 bis 4,5 Keimepithelzyklen, beim Menschen sind es exakt 4,6 Keimepithelzyklen. Bei einer Zyklusdauer von 16 Tagen ( $\pm 1d$ ) errechnet sich daraus eine Gesamtdauer der menschlichen Spermatogenese von etwa 74 Tagen ( $\pm 5d$ ) (*Clermont, 1963*). Bei *Macaca fascicularis* mit einer Zyklusdauer von 10 Tagen ( $\pm 0,5d$ ) dauert die Spermatogenese insgesamt ca. 40 - 45 Tage, bei der Maus mit rund 8,7 Tagen Zyklusdauer ca. 35 – 39 Tage und beim Hengst (12 Tage Zyklusdauer) 48 – 54 Tage.

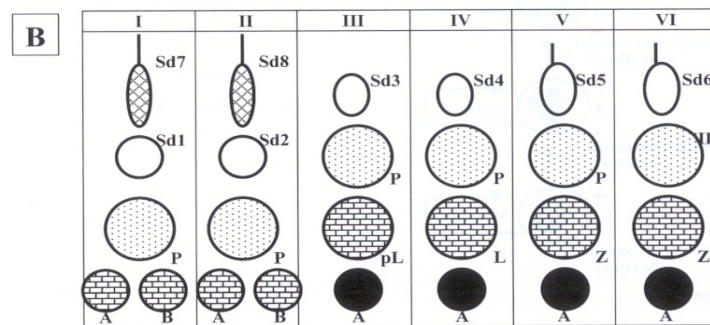
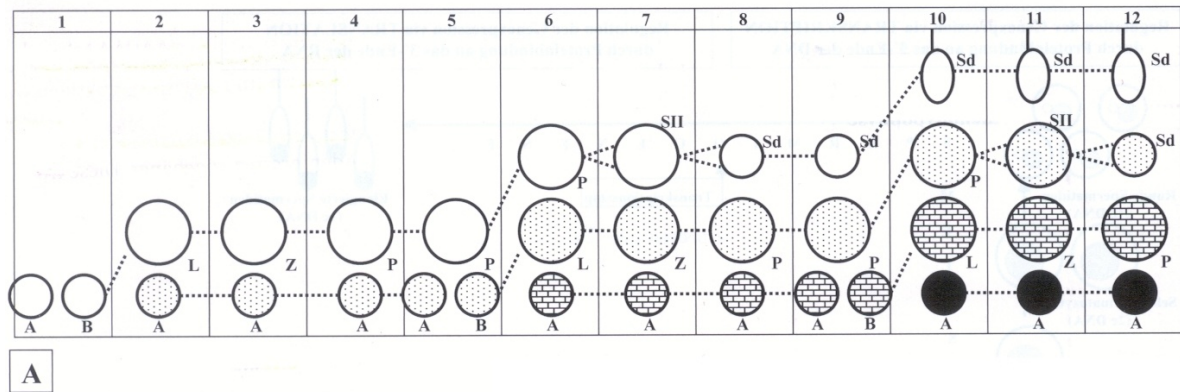


Abb.4 Aufbau (A) und Stadien (B) des Keimepithelzyklus am Beispiel des Menschen (Steger, 2001a).

Verschiedene Markierungen repräsentieren unterschiedliche Keimzellgenerationen.

A-Spermatogonie (A), B-Spermatogonie (B),

Primäre Spermatozyte im Präleptotän (pL), Leptotän (L), Zygotän (Z), Pachytän (P),

Sekundäre Spermatozyte (SII), Spermatiden step 1-8 (Sd 1-8).



## 2.2 Regulationsmechanismen der Spermatogenese

### 2.2.1 Endokrine Regulation

Hierbei wirken die Hormone von Hypothalamus, Adenohypophyse und Gonaden innerhalb komplexer Regelkreise zusammen (*Weinbauer et al., 1996*) (vgl. Abb.5):

Der Hypothalamus setzt pulsatil GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone, Gonadoliberin) frei, welches auf gonadotrope Zellen der Adenohypophyse einwirkt.

Die Adenohypophyse gibt nach GnRH-Stimulation membranständiger Rezeptoren LH (Luteinisierendes Hormon = ICSH, Interstitial Cell Stimulating Hormone) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon) ab. Dabei wirkt LH auf die Leydig-Zellen (Stimulation der Testosteronbiosynthese) und FSH auf die Sertoli-Zellen (Aktivierung der Adenylatzyklase und Bildung von androgenbindendem Protein (ABP)). Es erfolgt eine negative Rückkopplung via überregionaler Regelkreise: erhöhte Plasmaspiegel von Testosteron, seiner Metaboliten oder von Östradiol hemmen die LH-Freisetzung (vermutlich über Hemmung der GnRH-Abgabe im Hypothalamus), Inhibin aus den Sertoli-Zellen verhindert eine übermäßige FSH-Freisetzung aus der Hypophyse, fördert aber gleichzeitig die LH-Abgabe.

Im Hoden synthetisieren die Leydig-Zellen aus Cholesterin Testosteron, welches unter anderem die Spermatogenese fördert. Die lokale Steuerung der Spermatogenese erfolgt durch testikuläre Regelkreise, wobei Leydig-, Sertoli- und peritubuläre myofibroblastische Zellen diverse Regulationsfaktoren erzeugen (u.a. androgenbindendes Protein, Transferrin, Anti-Müller-Hormon, Plasminogen-Aktivator).

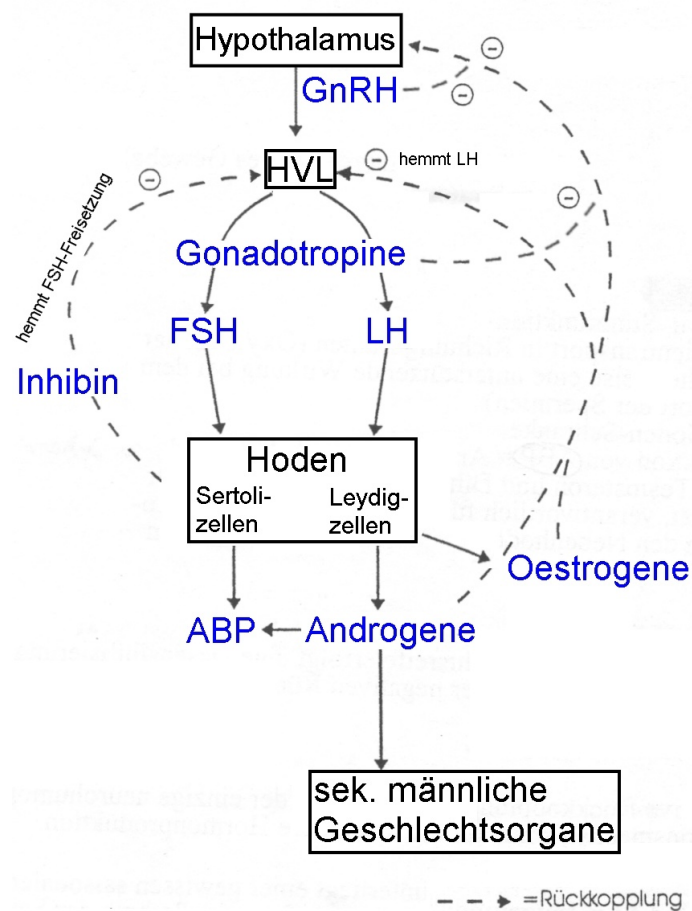


Abb.5 Endokrine Regulation der Spermatogenese.

GnRH = Gonadotropin Releasing Hormone, FSH = Follikelstimulierendes Hormon, LH = Luteinisierendes Hormon, ABP = Androgenbindendes Protein.

Weitere Erklärungen im Text.

## 2.2.2 Genetische Regulation

### 2.2.2.1 Sequentielle Expression von Nukleoproteinen im Verlauf der Spermatogenese

Im Gegensatz zu der endokrinen Regulation ist das Wissen über genetische Regulationsvorgänge der Spermatogenese noch gering. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen aber, daß der sequentiellen Expression von Nukleoproteinen eine zentrale Bedeutung für die Produktion befruchtungsfähiger Spermien zukommt (Steger 1999a, 2001b). Während der Spermiogenese durchlaufen die reifenden haploiden Spermatiden drei Prozesse:

- Akrosombildung
- Ausbildung des Flagellums
- Histon-Protamin-Austausch

Hierbei kommt dem Histon-Protamin-Austausch für die männliche Fertilität eine zentrale Bedeutung zu (Steger, 1999a, 2001b). Diese Aussage wird durch Ergebnisse der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) im Rahmen der assistierten Reproduktion bestätigt, da bei dieser Technik die natürlichen Selektionsmechanismen umgangen werden (Steger, 2003). Die folgenden Ausführungen beschränken sich daher auf die mit dem Histon-Protamin-Austausch in Zusammenhang stehenden Vorgänge in Spermatiden.

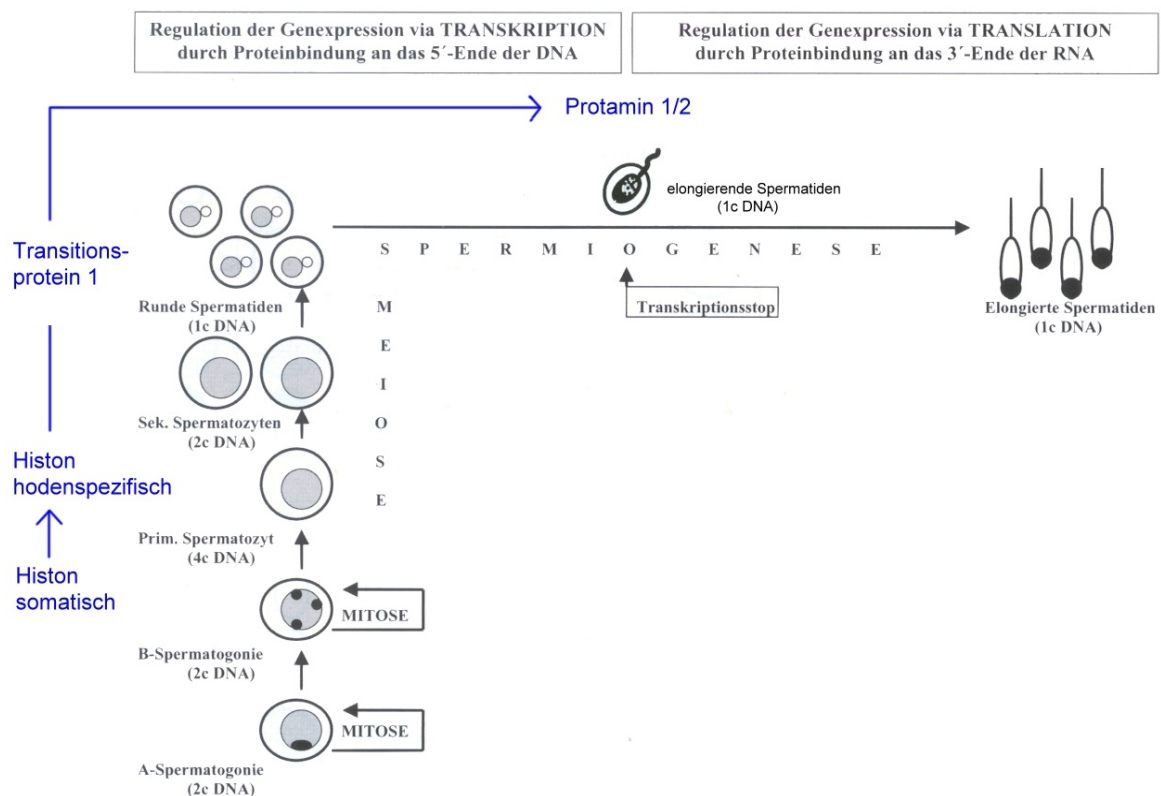


Abb.6 Schema der Spermatogenese mit sequentieller Expression von Kernproteinen am Beispiel Mensch (modifiziert nach Steger, 2001a). Erklärungen zur Regulation der Genexpression via Transkription und Translation erfolgen in Kap.2.2.2.2.

Im Rahmen der Spermatogenese wurden bereits während der Meiose ein Teil der DNA-bindenden somatischen Histone durch hodenspezifische Histonvarianten wie H1t ersetzt.

Daraufhin erfolgt in runden Spermatiden zunächst ein Austausch der Histone (und Nicht-Histon-Proteine) durch Transitionsprotein. Letzteres wird schließlich in elongierenden Spermatiden durch Protamine ersetzt (*Hecht, 1989a/1990a, Oliva und Dixon, 1991, Dadoune, 1995, Wouters-Tyrou et al., 1998*), die den Hauptteil des Chromatins in elongierten Spermien, Spermatozoen und reifen Spermien darstellen (Abb.6).

Die DNA-Protamin-Wechselwirkungen führen zu einer Zunahme der Chromatinkondensation und verursachen letztlich einen Stop der Transkription in elongierenden Spermatiden. Dieser Transkriptionsstop erfolgt zu einem Zeitpunkt, wo im Laufe der Spermiogenese noch viele Proteine für die vollständige Chromatinkondensation sowie die Bildung von Akrosom und Flagellum benötigt werden (*Kierszenbaum und Tres, 1975, Balhorn et al., 1984*). Dies führt zu einer für haploide Spermatiden typischen zeitlich versetzten aber stadienspezifischen Expression von mRNA und Protein, verursacht durch eine Entkoppelung von Transkription und Translation.

Bei Mensch und Pferd wurde gezeigt (*Steger et al., 1998, Steger, 1999a, Steger et al., 2000a*), daß Transkripte und Proteine der hodenspezifischen Kernproteine H1t, Transitionsprotein-1, Protamin-1 und -2 sowie CREM während der normalen Spermatogenese in exakt festgelegter Reihenfolge zell- und stadienspezifisch exprimiert werden. Beim Menschen ergibt sich folgende Reihenfolge (vgl. Abb.7):

Protein und mRNA des hodenspezifischen Histons H1t treten zum Teil zeitgleich in pachytänen Spermatozyten auf: die H1t-mRNA wird im Zytoplasma von mittleren bis späten pachytänen Spermatozyten der Stadien III-V des Keimepithelzyklusses nachgewiesen, H1t-Protein im Nukleus von pachytänen Spermatozyten des Stadium III bis zu step 5 Spermatiden. Transitionsprotein-1 (Tnp-1) und die beiden Protamine (Prm-1/-2) werden in runden und elongierenden Spermatiden transkribiert (mRNA für Tnp-1 in step 2-4 Spermatiden, für Prm-1/-2 in step 1-4 Spermatiden). Die entsprechenden Proteine zeigen sich mit zeitlicher Verzögerung zur jeweiligen mRNA in elongierenden und elongierten Spermatiden: Tnp-1-Protein in step 3-4 Spermatiden und Prm-1/-2-Protein in step 4-8 Spermatiden (*Roux et al., 1987, 1988, LeLannic et al., 1993, Lescoat et al., 1993, Prigent et al., 1996, Siffroi et al., 1999*).

Die Transkription von CREM findet in mittleren und späten pachytänen Spermatozyten der Stadien IV und V sowie in runden step 1-3 Spermatiden statt, während das korrespondierende Protein nur in runden step 1-3 Spermatiden exprimiert wird (Stadium I-III des Keimepithelzyklus) (*Steger et al., 1999a*).

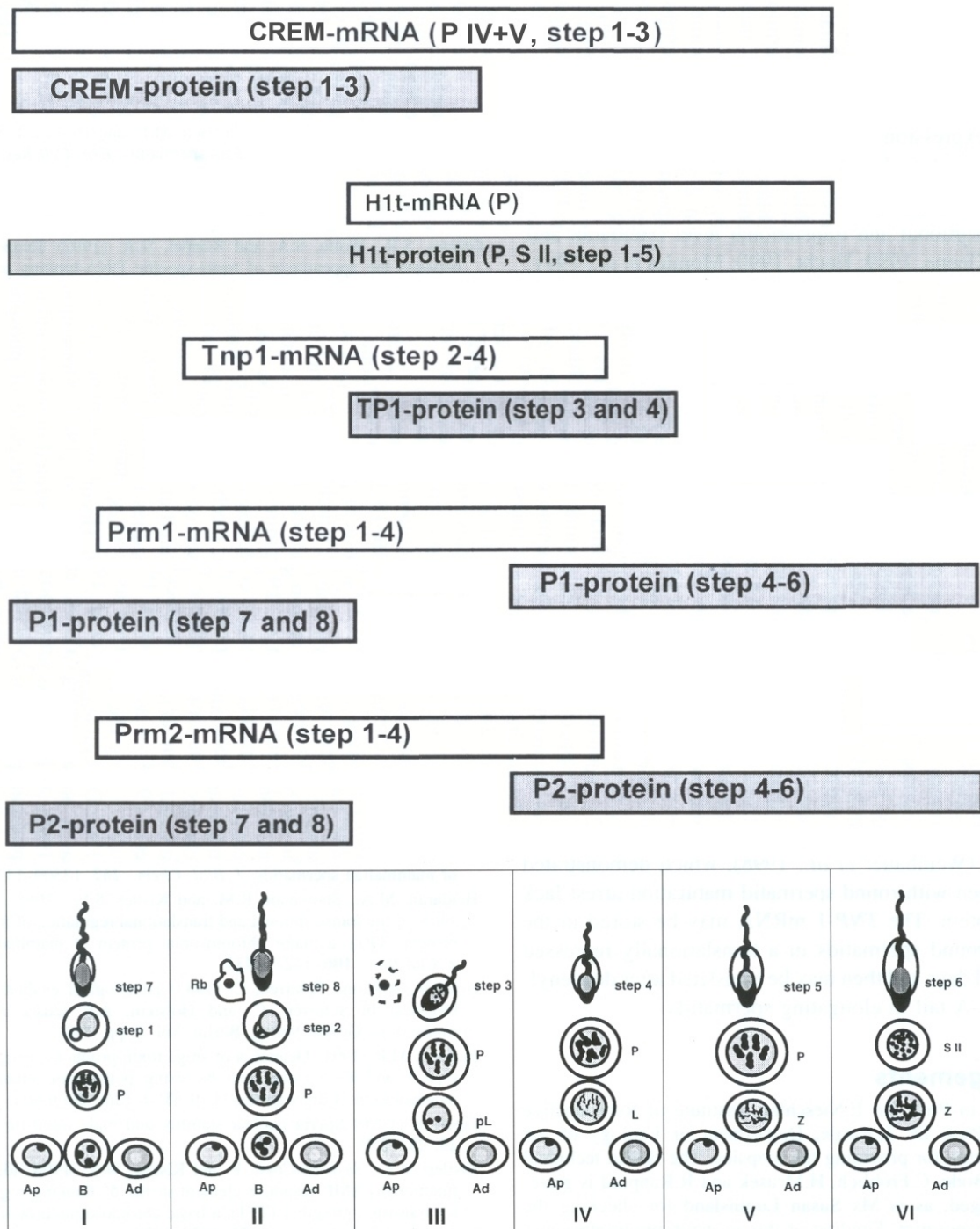


Abb.7 Stadienspezifisches Verteilungsmuster von CREM, H1t, Tnp-1 und Prm-1/2 bei normaler Spermatogenese des Menschen (Steger *et al.*, 1998, 1999a).

weiße Kästen = mRNA, grau unterlegte Kästen = korrespondierendes Protein.

Unten Keimepithelzyklus des Menschen (vgl Abb.4 und 20).

Beim Pferd konnte die mRNA von Tnp-1 und Prm-1/-2 nur in runden Spermatiden nachgewiesen werden, nämlich Tnp-1-mRNA in Spermatiden der Stadien VIII bis V und Prm-1/-2-mRNA in Spermatiden der Stadien I bis VI (modifiziertes Schema der Abb.20). Die Expression von H1t und CREM wurde hierbei nicht untersucht (Steger *et al.*, 2003).

Eine interessante Beobachtung ist die Fähigkeit haploid exprimierter Transkripte, frei durch Zytoplasmabrücken zu diffundieren, um so individuellen strukturellen Erfordernissen einzelner Keimzellen nachzukommen. So werden selbst bei normaler Spermatogenese Protamingene nicht in jeder Spermatide transkribiert. Man geht davon aus, daß der Austausch von Transkripten zwischen haploiden Spermatiden ein generelles Phänomen dieser Zellen darstellt (Caldwell und Handel, 1991, Miller, 1997, Morales *et al.*, 1998), somit entsprechen sie funktionell diploiden Zellen.

#### 2.2.2.2 Überblick über verschiedene Regulationsmöglichkeiten der Genexpression

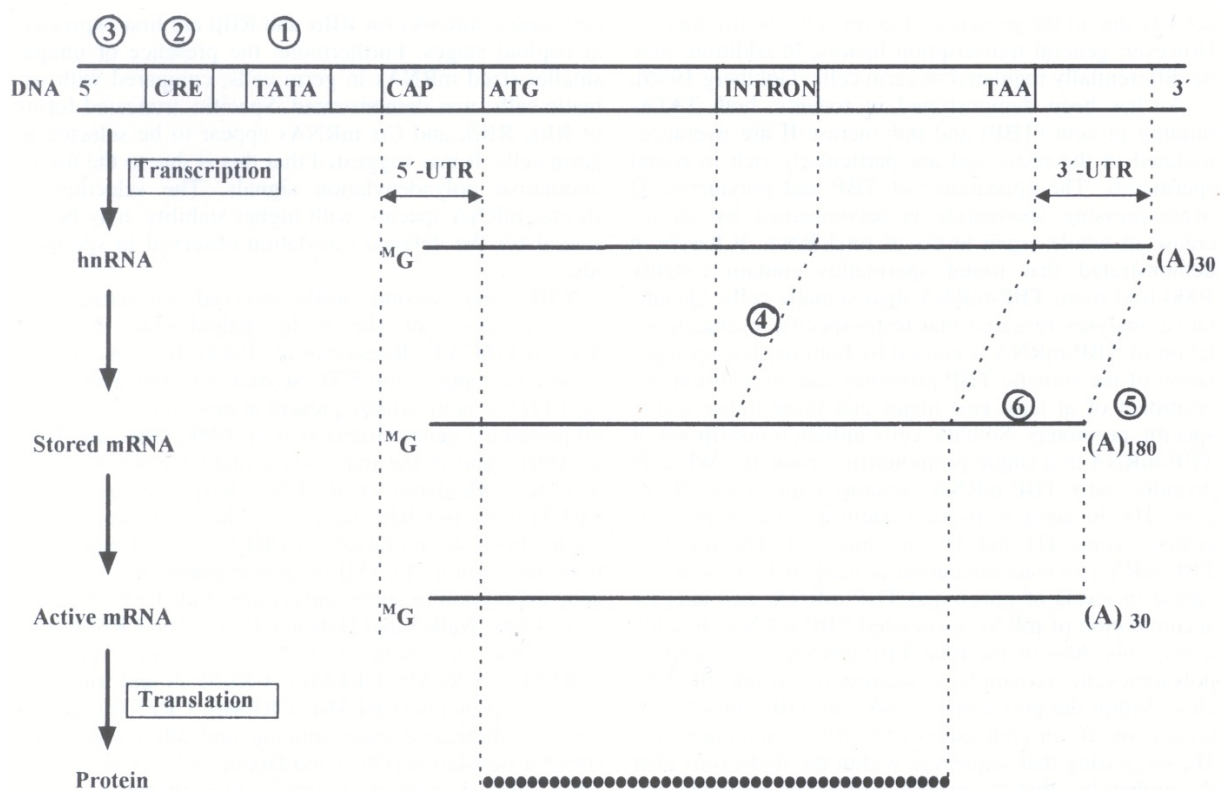


Abb.8 Regulation der Expression eines beliebigen Gens im Rahmen der Spermiogenese. Fortsetzung siehe Folgeseite.

#### Abb.8 Fortsetzung

Regulation der Expression eines beliebigen Gens im Rahmen der Spermiogenese über Bindung von Transkriptionsfaktoren an 1) TATA-Box, 2) CRE-Box, 3) andere spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion. 4) Alternatives Spleißen der RNA. Bindung von RNA-Bindungsproteinen an 5) Poly-A-Schwanz, 6) spezifische RNA-Sequenzen in der 3'UTR (*Steger, 1999a*).

ATG = Start Codon, TAA = Stop Codon, 3'UTR bzw. 5'UTR = 3' bzw. 5' untranslated region, CAP = methyliertes G-Nukleotid am 5'Ende, (A)<sub>x</sub> = Poly-A-Schwanz am 3'Ende, hnRNA = high nuclear RNA. Ausführliche Erklärungen im Text.

Die Regulation der Transkription erfolgt durch Methylierung und durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an die TATA-Box, die CRE-Box oder andere spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion von Zielgenen (vgl. Abb.8 und 9).

- Methylierung (in Abb.8 nicht dargestellt)

Der Mechanismus der DNA-Methylierung tritt ausschließlich an der 5'-Seite von Cytosin in der Promotorregion von Genen auf und findet sich insbesondere in runden und weniger in elongierten Spermatiden (*Reddy und Reddy, 1990*).

- Bindung von TATA-box-binding protein (TBP) an die TATA-Box (Abb.8 Nr.1)

Die TATA-Box kommt in allen bislang untersuchten Protamingenen (*Hecht 1989, 1990, Oliva und Dixon, 1991, Dadoune, 1995*) und im Transitionsprotein-1-Gen der Maus vor (*Heideran et al., 1989*). Es ist bekannt, daß sie eine wichtige Rolle bei der korrekten Initiierung der Transkription via Bindung von Transkriptionsfaktoren spielt (*Dynan und Tjian, 1985*).

- Bindung von cAMP-responsiven Transkriptionsfaktoren (CREM, CREB, ATF-1) an die CRE-Box (Abb.8 Nr.2, Abb.9)

Die Modulation der Transkription cAMP-induzierbarer Gene über den Adenylatzyklase-Signaltransduktionsweg erfolgt durch Bindung der Transkriptionsfaktoren cAMP-responsive-element-binding (CREB) Protein, cAMP-responsive-element-modulator (CREM) Protein oder activating transcription factor 1 (ATF-1) an die cAMP-responsive-element (CRE) Box (*Lalli*



*et al.*, 1996, Walker und Habener, 1996, Sassone-Corsi, 1998). Bislang nicht identifizierte Liganden interagieren mit G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren, welche die rezeptorgebundene Adenylatzyklase zur Konvertierung von ATP in cAMP stimulieren und eine intrazelluläre Akkumulation von cAMP erzeugen. Dies verursacht die Dissoziation der Proteinkinase-A in ihre regulatorische und katalytische Untereinheiten, wobei letztere im Nukleus CREB oder CREM durch Phosphorylierung eines Serin-Restes in Position 133 (CREB) bzw. Position 117 (CREM) aktivieren. Aktiviertes CREB oder CREM kann nun an CRE binden, welches dann wiederum das entsprechende Zielgen aktiviert (*Delmas et al.*, 1992, 1993, *de Groot et al.*, 1993, *Tamai et al.*, 1997). Es ist zudem bekannt, daß CREM- und CREB-Gene die Bildung unterschiedlicher Isoformen mit aktivierender wie auch reprimierender Funktion in Bezug auf die Zielgenexpression generieren können (*Gellersen et al.*, 2002, siehe dazu auch Kap. 2.2.2.3.2).

Die CRE-Box besteht bei allen bislang untersuchten Säugetieren aus der 8 bp Konsensus-Palindromsequenz 5'TGACGTCA3'(*Roesler et al.*, 1988) und ist beim Menschen leicht modifiziert: 5'TGACAGCA3'(*Oliva und Dixon*, 1991). Sie kommt unter anderem in der Promotorregion der Gene für Protamin-1 und -2 (*Johnson et al.*, 1988, *Oliva und Dixon*, 1991) sowie des Gens für Transitionsprotein-1 des Menschen und der Maus (*Heideran et al.*, 1989, *Kistler et al.*, 1994) stets auf Position -57 bis -48 vor.

- Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Y-Box (Abb.8 Nr.3)

Bei der Y-Box handelt es sich um ein in MHC-Klasse-II-Genen konserviertes Promotorelement mit der Sequenz 5'CTGATTGGCCAA3', welches eine inverse CCAAT-Box enthält (*Didier et al.*, 1988). Man weiß, daß einige speziell in Keimzellen aktive Gene wie z.B. Protamin-1 und -2 der Maus übereinstimmende Y-Box-Sequenzen in ihren Promotorregionen besitzen (*Zambrowicz et al.*, 1993, *Nikolajczyk et al.*, 1995, *Yiu und Hecht*, 1997). Y-Box-Proteine, die an die Y-Box binden, gelten als generelle Modifikatoren der Genaktivität, sowohl im Rahmen der Transkription wie auch bei der Translation (*Sommerville und Lodomery*, 1996).

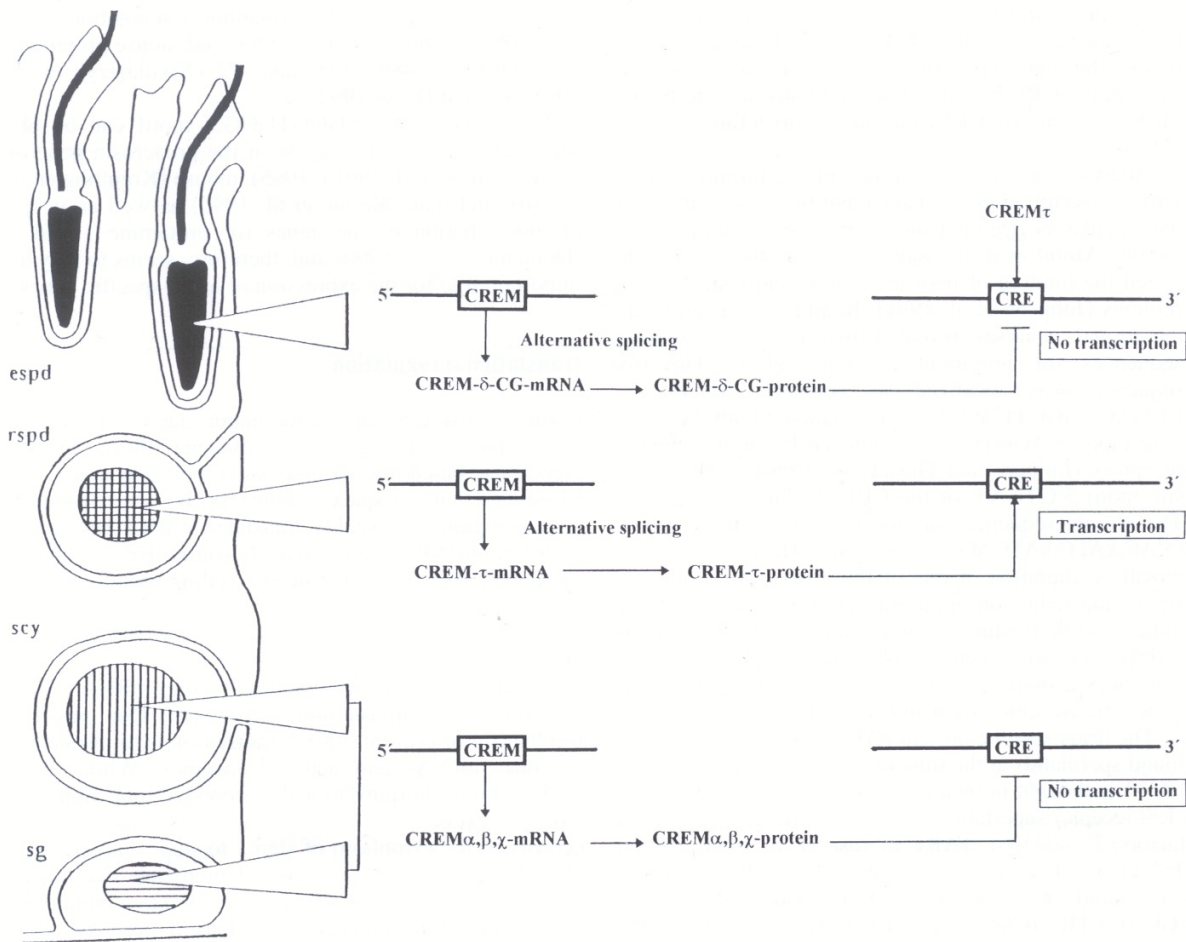


Abb.9 Bindung verschiedener CREM-Isoformen an die CRE-Box in primären Spermatozyten, runden und elongierten Spermatiden (Steger, 1999a). Siehe dazu auch Kap. 2.2.2.3.2.

sg = Spermatogonie, scy = Spermatozyte, rspd = runde Spermatide, espd = elongierte Spermatide.

Die Regulation der Translation erfolgt durch Bindung von Proteinrepressoren an den Poly-A-Schwanz (Abb.8 Nr.5) und an spezifische mRNA Sequenzen in der 3'-UTR (3'untranslated region) (Abb.8 Nr.6) (vgl. Abb. 10).

Nachdem die Abtrennung primärer Transkripte (hnRNAs, high nuclear RNAs) ca. 30 Nukleotide strangabwärts des Polyadenylierungssignals 5'AAUAAA3' erfolgte, wird in

runden Spermatiden an das freie 3' Ende der Schnittstelle sofort ein Poly-A-Schwanz aus 160-180 Adeninresten angehängt. Der nachfolgende translationale Arrest in runden Spermatiden beruht auf einer bis zu einwöchigen Speicherung dieser mRNA als messenger Ribonukleoprotein (mRNP) Partikel (*Stern et al., 1983, Penttilä et al., 1995, Kleene, 1996*) in chromatoid bodies im Zytoplasma (*Biggiogera et al., 1990, Moussa et al., 1994*) und wird verursacht durch Bindung von Proteinrepressoren an die 3'UTR (Abb.8 Nr.6) und den Poly-A-Schwanz (Abb.8 Nr.5) der mRNAs auf der Stufe von runden step 3 Spermatiden (*Steger, 1999a*). Die Translation findet dann in elongierten Spermatiden statt, sobald der Poly-A-Schwanz der mRNA durch Deadenylierung gekürzt wurde (*Kleene et al., 1984, Heidaran und Kistler, 1987, Hecht, 1989b, 1990b, Kleene, 1989, 1993, 1996, Morales et al., 1991, Eddy et al., 1993, Dadoune 1995, Penttilä et al., 1995, Cataldo et al., 1999*). Die Länge des Poly-A-Schwanzes der mRNAs korreliert demnach mit der translationalen Aktivität; mRNAs mit Poly-A-Schwänzen von rund 30 Adeninresten gelten als translational aktiv.

Daß die Translationsregulation durch Bindung von Proteinrepressoren erfolgt, wird durch die Tatsache untermauert, daß Deproteinierung von Protamin-1-mRNA aus runden Spermatiden *in-vitro* die Translation auslöst (*Fajardo et al., 1994, Kleene und Smith, 1994*). Die Stabilität der mRNAs wird durch Anlagerung von Poly-A-Bindungsprotein (PABP) beeinflusst. Wandert dieses vom Poly-A-Schwanz zu AU-reichen Regionen in der 3'UTR, erfolgt die Initiierung der Translation, da der Poly-A-Schwanz dadurch ungeschützt der Deadenylierungsreaktion ausgesetzt ist (*Bernstein und Ross, 1989, Bernstein et al., 1989*) (vgl. auch Abb. 10).

Man konnte nachweisen, daß die Bindung sequenzspezifischer RNA-Bindungsproteine an ein definiertes 62 bp Element im Bereich der 3'UTR, welches sowohl das Polyadenylierungssignal 5'AAUAAA3' als auch eine hochkonservierte 20-22 bp lange Sequenz enthielt, einen Stop der Translation in runden Spermatiden herbeiführte (*Braun et al., 1989*). Die bereits erwähnten Y-Box Proteine (Abb.8 Nr.6) sollen gleichzeitig als sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine und sequenzunspezifische RNA-Bindungsproteine fungieren (*Ladomery und Sommerville, 1994, Wolffe, 1994, Sommerville und Ladomery, 1996*), wobei als mögliche Regulationsmechanismen der Bindung letzterer Phosphorylierung (*Herbert und Hecht, 1999*) und Zink-Finger-Strukturen (*Arranz et al., 1997*) diskutiert werden.

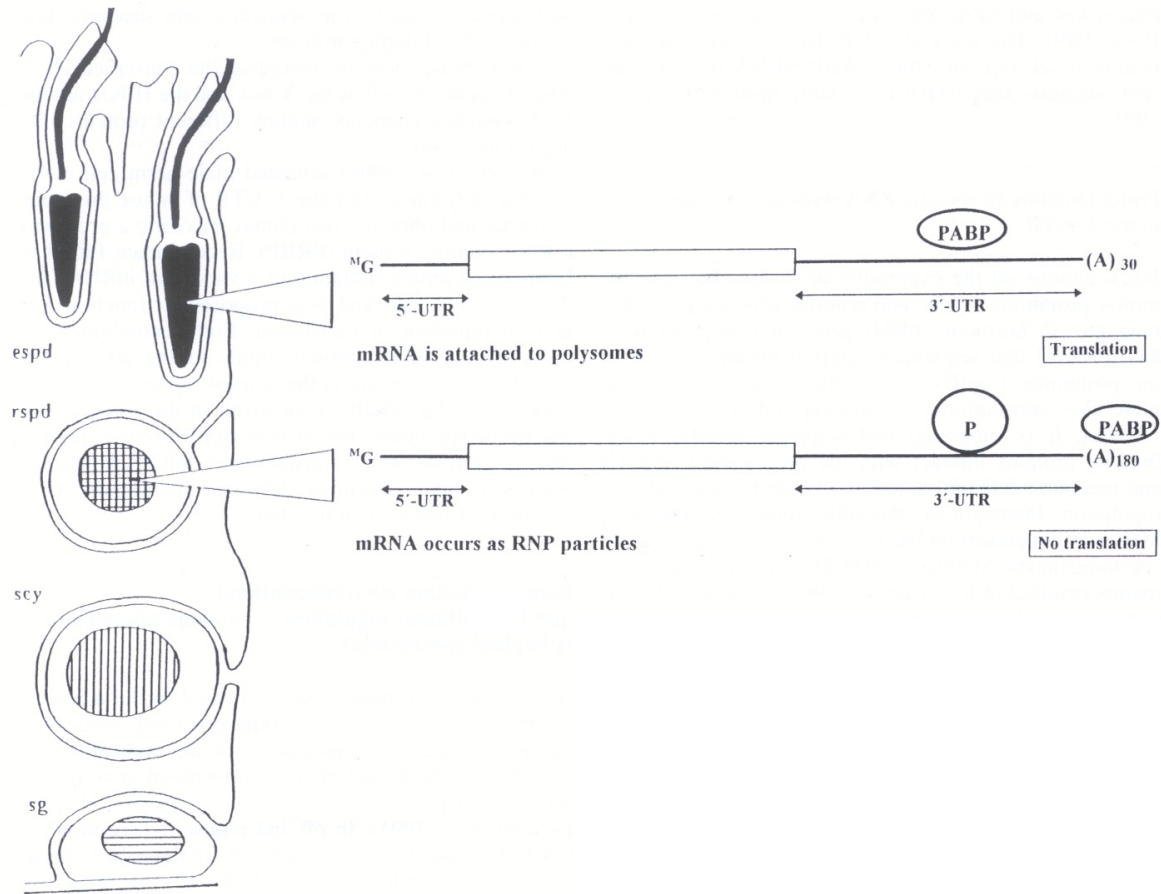


Abb.10 Translationale Kontrolle in runden und elongierten Spermatiden (Steger, 1999a).

sg = Spermatogonie, scy = Spermatozyte, rspd = runde Spermatide, espd = elongierte Spermatide, P = RNA-Bindungsproteine, PABP = Poly-A-Bindungsprotein.

### **2.2.2.3 Die Transkriptionsfaktoren CREM und CREB als zentrale Regulatoren der Spermatogenese**

#### **2.2.2.3.1 Physiologische Funktionen von CREM und CREB**

Der cAMP-abhängige Signalübertragungsweg ist bei der Modulierung der Genexpression in Keimzellen insbesondere im Bereich der Transkription maßgeblich beteiligt und spielt bei Säugetieren eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Hodenfunktion (*Sassone-Corsi, 1995*). Er steuert die Expression von Genen, welche für Strukturproteine maturer Spermatozoen kodieren, über eine Familie nukleärer Transkriptionsfaktoren, die als wichtiges Strukturelement ein basic domain/ leucin zipper (bZIP) Motiv beinhalten, welches an cAMP-response elements (CREs) im Promotor der Zielgene bindet (*Walker und Habener, 1996, Montminy, 1997*). Die bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren cAMP-responsive-element-binding (CREB) Protein, cAMP-responsive-element-modulator (CREM) Protein sowie activating transcription factor 1 (ATF-1) gehören zu dieser bZIP-Familie und zeichnen sich durch ein hohes Maß an Sequenzhomologie aus. CREM und CREB spielen in vielen physiologischen Systemen eine wichtige Rolle. Als Beispiele seien hier nur regulative Funktionen im Zusammenhang mit Gedächtnis und Erinnerung, zirkadianen Rhythmen, Hypophysenfunktion und Spermatogenese genannt (*Sassone-Corsi, 1995, de Cesare und Sassone-Corsi, 2000*).

In adulten männlichen Keimzellen jedoch fand man eine CREM-Expression, welche die anderer Körpergewebe weit mehr als hundertfach überstieg (hoher Prozentsatz an Aktivator-Isoformen, siehe dazu 2.2.2.3.2). Man konnte nachweisen, daß CREM im Hodengewebe der transkriptionalen Aktivierung mehrerer post-meiotischer Gene dient, deren Promotoren die CRE-Box enthalten und die größtenteils für Proteine kodieren, welche für die Differenzierung der Spermatisiden im Rahmen der Spermiogenese erforderlich sind (*Sassone-Corsi, 1995, 1998, Fimia et al., 1998*).

Bei normaler Spermatogenese ist CREM-mRNA in mittleren und späten pachytänen Spermatozyten der Stadien IV und V nachweisbar sowie in runden step 1-3 Spermatisiden (außerdem sehr geringe Mengen an CREM-mRNA-Repressor-Isoformen in Spermatisiden), während CREM-Protein mit zeitlicher Verzögerung nur in runden step 1-3 Spermatisiden exprimiert wird (Stadium I-III des Keimepithelzyklus) (*Weinbauer et al., 1998, Steger et al., 1999*) (Vgl. Abb.7).

Es sind bereits mehrere Zielgene CREM-vermittelter Transaktivierung in Keimzellen beschrieben worden, wie zum Beispiel die Gene für humanes Protamin-1 und -2 (*Oliva und Dixon, 1991*), für humanes Transitionsprotein-1 (*Kistler et al., 1994*) sowie für angiotensin-converting enzyme (*Zhou et al., 1996*) und Calspermin (*Sun et al., 1995*), die alle eine CRE-Box im Promotor enthalten. In einer Studie von *Steger et al. (1999)* konnte gezeigt werden, daß die Expression von CREM eng mit der des Gens für Tnp-1 korreliert (siehe unten). CREM dürfte also vornehmlich eine Rolle in der Aktivierung von Genen spielen, welche primär für spätere Differenzierungsschritte der Spermatiden erforderlich sind.

Auch CREB wurde im Hodengewebe nachgewiesen, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als CREM. Die genaue Funktion muß noch geklärt werden, allerdings ist bereits bekannt, daß CREB knock-out Mäuse eine normale Spermatogenese aufweisen (*Hummeler et al., 1994, Zhou et al., 1996*).

#### **2.2.2.3.2 Bau des CREM-Gens und CREM-Isoformen**

Das CREM-Gen besteht aus mindestens 10 Exons (*Masquillier et al., 1993, Walker und Habener, 1996*), welche für funktionelle Domänen kodieren (*Sassone-Corsi, 1995*) (Siehe Abb.11).

Das 5'Ende des CREM-Gens enthält eine Aktivierungsdomäne, die in zwei unabhängige Bereiche unterteilt ist (*Gonzales et al., 1991, Laoide et al., 1993, Quinn, 1993*). Die eine Region, die P-Box (phosphorylation box) bzw. KID (kinase inducible domain), umfaßt mehrere Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen, die das Transaktivierungspotential des Proteins regulieren. Die andere Region beinhaltet zwei glutaminreiche Domänen, Q1 und Q2, welche die P-Box flankieren (*Foulkes et al., 1991, Sassone-Corsi, 1995*) und mit anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagieren können (insbesondere Q2). Es wurde nachgewiesen, daß P-Box und Q2-Domäne ausreichend für die Vermittlung der cAMP-induzierten Transkription sind (*Hai et al., 1989, Brindle et al., 1993*).

Am 3'Ende des Gens befindet sich die DNA-Bindungsdomäne, welche aus basic-domain (BD) und leucine-zipper (LZ) aufgebaut ist (bZIP-Familie!).

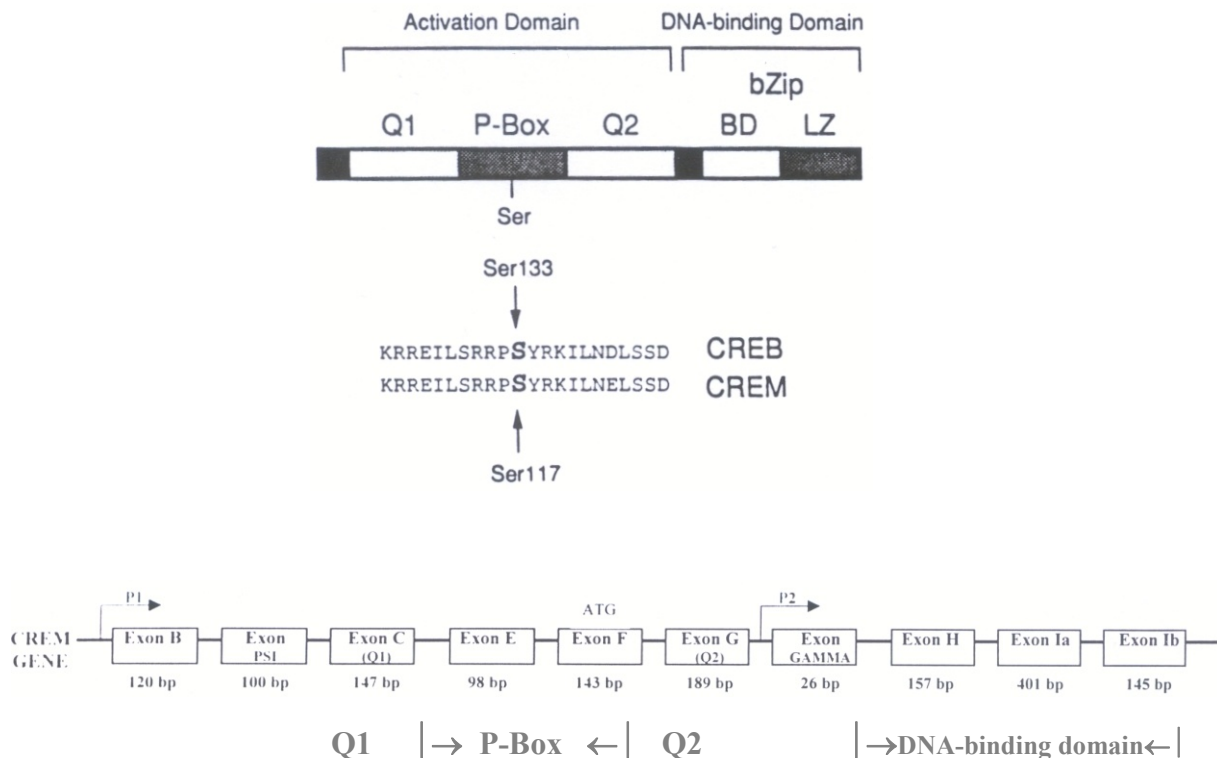


Abb.11 Das CREM-Gen (*Fimia et al., 1998, Masquillier et al., 1993*).

Q1/ Q2 = glutaminreiche Domänen, P-Box = phosphorylation box, BD = basic domain, LZ = leucin zipper, P = Promotoren (P1 = nicht cAMP-responsiv, P2 = aktivierbar durch cAMP).

Aufgrund alternativer Startpunkte der Transkription, alternativen Spleißens der Transkripte sowie alternativer Startregionen der Translation, ermöglicht das CREM-Gen die Synthese funktionell unterschiedlicher Proteine mit sowohl aktivierender als auch reprimierender Wirkung auf die Zielgenexpression (*Oliva und Dixon, 1991, Delmas et al., 1992, 1993, Laoide et al., 1993, Masquillier et al., 1993, Kistler et al., 1994, Walker et al., 1994, Sassone-Corsi, 1995, Walker und Habener, 1996, Sassone-Corsi 1998, Daniel et al., 2000, Behr und Weinbauer, 2001, Gellersen et al., 2002*). Während CREM-Repressorisoformen im Organismus weit verbreitet sind (*Uyttersprot und Miot, 1997*), wurden Aktivatorformen bislang in erster Linie im Hoden nachgewiesen, wo ihre Expression einer differentiellen Regulation unterliegt (*Foulkes et al., 1992, Delmas et al., 1993, Weinbauer et al., 1998, Behr und Weinbauer, 1999, Steger et al., 1999*). Im Rahmen der normalen Spermatogenese kommt es zu einer abrupten Änderung der CREM-Genexpression (Switch), die zur Ausbildung funktionell unterschiedlicher CREM-Isoformen führt (vgl. Abb.9). Während in Spermatogonien und Spermatozyten ausschließlich mRNA von Repressoren erzeugt wird,

findet man in den post-meiotischen Keimzellen und hier insbesondere in runden Spermatiden mRNA von Aktivatoren (*Foulkes et al., 1992, 1993, Delmas et al., 1992, 1993, Monaco et al., 1996, Peri et al., 1998*).

Repressoren entstehen durch Deletion der Exons C und G sowie der Exons C bis H, durch alternativen Start der Translation in Exon F und/oder durch Verwendung eines zweiten Promotors.

- Die Repressoren CREM $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , welche keine glutaminreichen Regionen enthalten, bilden entweder Homo- oder Heterodimere mit CREB oder binden nicht funktionell an CRE und sind somit inaktiv (*Delmas et al., 1992, 1993*).
- Der inducible-cAMP-early Repressor (ICER) wird von einem alternativen cAMP-modulierten CREM-Promotor innerhalb eines Introns nahe dem 3'Ende des CREM-Gens gebildet und reprimiert im Sinne eines negativen autoregulatorischen Feedbacks die Aktivität seines eigenen Promotors und damit der cAMP-induzierten Transkription (*Molina et al., 1993, Stehle et al., 1993, Lamas et al., 1996, Tamai et al., 1997, Sassone-Corsi, 1998*).
- Dem Repressor CREM- $\Delta$ CG fehlen Exons, welche die durch Proteinkinase A regulierte Phosphorylierungsdomäne und die flankierende glutaminreiche transkriptionale Aktivierungsdomäne kodieren. CREM- $\Delta$ CG bindet vor allem in elongierten Spermatiden an CRE und inhibiert so kompetitiv die Bindung von CREM bzw. CREB (*Walker et al., 1994*).  
Inzwischen wurden beim Menschen vier weitere Repressoren nachgewiesen: CREM  $\gamma$  (BEFH $\beta$ , 693 bp), CREM $\Delta$ C-F $\beta$  (BGH $\beta$ , 641 bp), CREM $\Delta$ C-G $\beta$  (BH $\beta$ , 452 bp) und CREM $\Delta$ C-G $\alpha$  (BH $\alpha$  $\beta$ , 852 bp) (*Behr und Weinbauer, 2000*).

Aktivatoren (CREM $\tau\alpha$ , CREM $\tau$ , CREM $\tau$ 1, CREM $\tau$ 2) besitzen stets die beiden Exons E und F (P-Box) sowie mindestens eines der beiden Exons C und G, die die P-Box flankieren. CREM $\tau$ -mRNA ist größtenteils im Zytoplasma runder Spermatiden lokalisiert.

*Behr et al. (2000)* postulierten in einer vergleichenden Studie mittels RT-PCR an Hodenextrakten einen möglicherweise evolutiven Trend von multiplen Aktivatorformen zu einer Aktivatorform. So trat beim Menschen nur eine Bande bei 578 bp (CREM $\tau$ 2: BEFGH) auf. Beim Java-Affen (*Macaca fascicularis*) sowie beim Rhesus-Affen (*Macaca mulatta*) fand sich eine zusätzliche Bande bei 603 bp (CREM $\tau$ 2: BEFG $\gamma$ H). Bei Maus, Ratte und Hamster wies man drei Transkripte (614 bp, 700 bp, 761 bp) nach.



In aktuellen Studien (*Daniel et al., 2000, Gellersen et al., 2002*) wurden zwei neue, unabhängig voneinander regulierte Promotoren (P3, P4) entdeckt, welche für die Aktivatoren CREM01 und CREM02 kodieren.

### **2.2.2.3.3 Aktivierung und Modulierung von CREM**

Zunächst ging man davon aus, daß CREM, ebenso wie in somatischen Zellen, auch im Keimepithel durch Phosphorylierung des Serinrestes an Position 117 innerhalb der P-Box über verschiedene Kinasen (klassisch: Proteinkinase A (PKA)) aktiviert würde (*Delmas et al., 1992, 1993, Sassone-Corsi, 1995, Lalli et al., 1996, Monaco et al., 1996, Walker und Habener, 1996*). Mögliche Liganden können durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren die Adenylatzyklase stimulieren, und die hieraus resultierende Akkumulation von cAMP bewirkt die Dissoziation von inaktiver Proteinkinase A in regulatorische und katalytische Untereinheiten, wobei letztere im Zellkern CREM durch Phosphorylierung aktivieren.

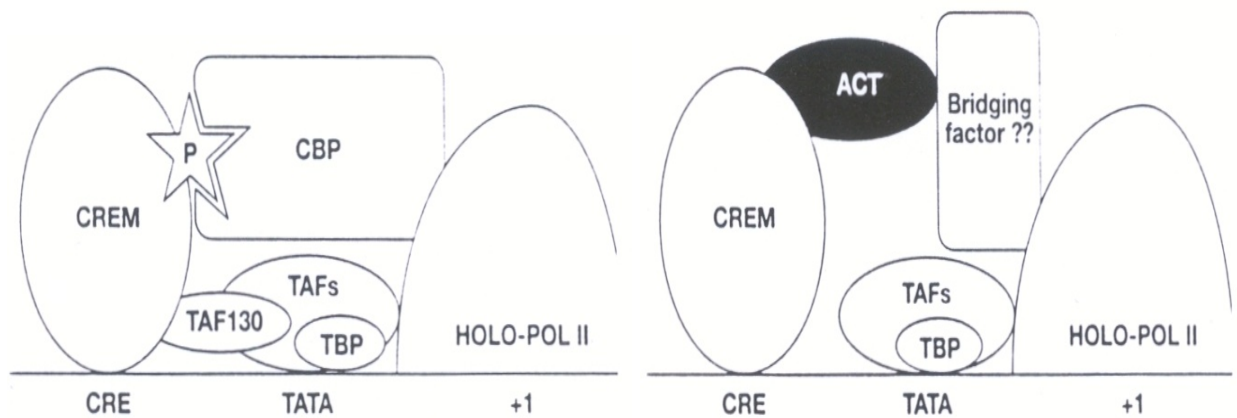
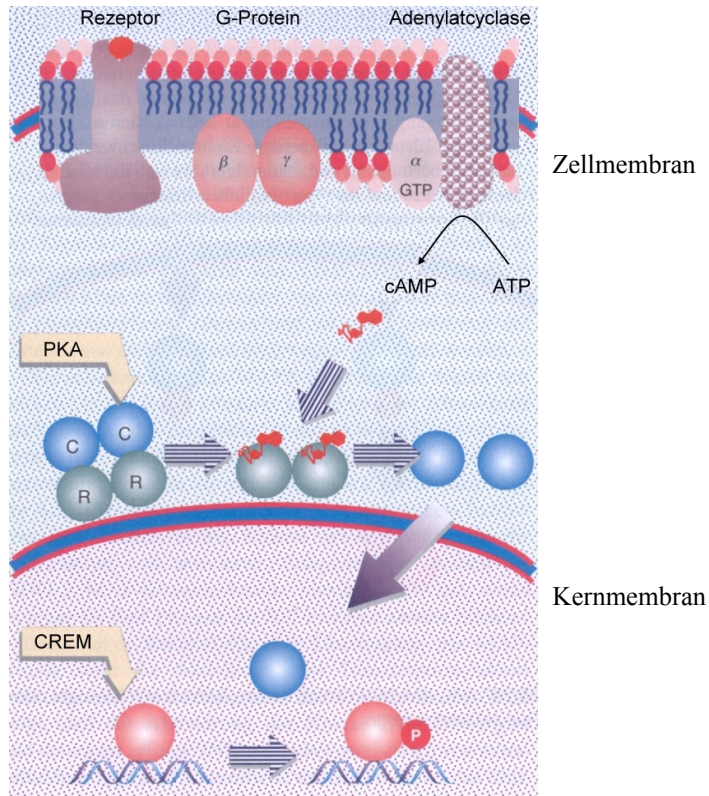
Es gibt Hinweise darauf, daß CREM bzw. CREB durch mehrere verschiedene Kinasen jeweils an Ser117 (CREM) bzw. Ser133 (CREB) phosphoryliert werden können, welche wiederum durch diverse Stimuli wie cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , Wachstumsfaktoren oder Stresssignale aktiviert werden (*de Cesare et al., 1999*). Diese Vielschichtigkeit der Signaltransduktion unterstreicht die zentrale Rolle von CREM bzw. CREB in Differenzierungs- und Proliferationsprozessen.

Die Phosphorylierung erlaubt auch die Rekrutierung von CREB-binding protein (CBP), einem Kofaktor mit Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität, der an die P-Box bindet und neben weiteren Koaktivatoren für die anschließende transkriptionale Aktivierung zwingend erforderlich ist (*Chrivia et al., 1993, Kwok et al., 1994, Lundblad et al., 1995*). CBP könnte gleichsam einer Brücke DNA-gebundene Aktivatoren mit dem basalen Transkriptionsapparat verbinden und mittels (De)Acetylierung von Aktivatoren und basalen Transkriptionsfaktoren deren Funktionsstatus modulieren.

Ein weiteres entscheidendes, nicht direkt phosphorylierungsabhängiges Element der Transaktivierung ist die Interaktion der glutaminreichen Region des CREM (speziell Q2) mit Proteinen des basalen Transkriptionsapparates, wie TATA-box-binding protein-associated Factor TAF130 (*Ferreri et al., 1994*) oder TFIIA (*De Cesare et al., 2003*), die im Hoden eine hohe Präsenz aufweisen.

Es wurde jedoch gezeigt, daß Substitution von Serin zu Alanin die CREM-Aktivität in runden Spermatiden nicht beeinflußt, was darauf hindeutet, daß in Keimzellen die Phosphorylierung von Serin-117 für die CREM-Aktivierung entbehrlich ist (*Fimia et al., 1999*). Außerdem konnte man nachweisen, daß CREM in dem Stadium, in dem es post-meiotisch die Gene der Keimzellen transkriptional aktiviert, in unphosphoryliertem Zustand vorliegt. Im Gegensatz zu den Verhältnissen in somatischen Zellen geht man daher im Hoden von einem alternativen phosphorylierungsunabhängigen Weg der CREM-Aktivierung durch den activator of CREM in testis (ACT) aus (*De Cesare et al., 2000*). Dieses LIM-only Protein (LMO) bestehend aus vier kompletten LIM-Domänen und einer halben N-terminalen Domäne (*Fimia et al., 1999*), welche doppelte cystein- und histidinreiche Zinkfingerstrukturen zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen ausbilden (*Sanchez und Rabbitts, 1994*), wurde unter Verwendung eines Yeast Two-Hybrid-Screens (Köder: Verschmelzungsprodukt Gal4-DNA-Bindungsdomäne an CREM-Aktivierungsdomäne) einer aus dem Hodengewebe der Maus abgeleiteten cDNA isoliert. Man demonstrierte seine Fähigkeit, die inaktive CREM-Mutante Ser-117>Ala-117 in ein transkriptional aktives Molekül umzuwandeln, sowohl in Hefezellen, welche bekannterweise kein CBP und TAF130 enthalten, als auch *in-vivo* in Mäusezellen (*Fimia et al., 1999*). ACT muß also eine intrinsische phosphorylierungsunabhängige Transaktivierungskapazität besitzen. Es kommt ausschließlich im Hodengewebe vor und zeigt sowohl bei der *in-situ* Hybridisierung als auch bei der Immunhistochemie eine Kolokalisation zu CREM in Spermatiden (*Delmas et al., 1993, Molina et al., 1993*). Auch weisen ACT und CREM im Rahmen der Hodenentwicklung dasselbe Expressionsmuster auf. Während es *Morgan und Whawell (2000)* nicht gelang, humane ACT-Transkripte mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse im Hoden aufzuzeigen, wiesen *Palermo et al. (2001)* die ACT-mRNA im menschlichen Hoden mittels RT-PCR nach.

Durch die Stimulierung kann CREM nun an die CRE-Box binden und die Aktivität nachgeschalteter Zielgene wie Protamin-1/2 oder Transitionsprotein-1 modulieren (*Delmas et al., 1992, 1993, Lalli et al., 1996, Monaco et al., 1996, Walker und Habener 1996*) (Siehe Abb.12).



CRE-Box in Promotorregion für Protamin-1/-2 (De Cesare et al., 2000)

HISTON SOMATISCH  
 ↓ in Spermatozyten ersetzt durch  
 HISTON HODENSPEZIFISCH  
 ↓ in Spermatiden ersetzt durch  
 PROTAMIN-1/-2

Abb.12 Zusammenfassende Grafik über die Möglichkeiten der CREM-Aktivierung (oberer Bildbereich) und den sequentiellen Austausch von Nukleoproteinen (unteres Bilddrittel).

Erklärungen zu Abb.12

Die CREM-Aktivierung erfolgt in somatischen Zellen über Phosphorylierung (links oben + Mitte), in Keimzellen durch ACT (rechts Mitte) (nach *De Cesare et al., 2000*).

PKA = Proteinkinase A, bestehend aus C (katalytische Untereinheiten) und R (regulatorische Untereinheiten)

P = Phosphorylierung an Serin 117 (im oberen Bilddrittel und Mitte links)

CBP = CREB-binding protein, TAF = TATA-box-binding protein-associated Factor, TBP = TATA-box-binding protein, CRE = CRE-box, TATA = TATA-box, HOLO-POLII = Polymerase

Weitere Erklärungen zur CREM-Aktivierung im Text Kap.2.2.2.3.3 und 2.2.2.2 und zum Kernproteinaustausch in Kap.2.2.2.1.

Man ging davon aus, daß die Expression von CREM und die CREM-Protein Aktivität im Rahmen der Spermatogenese über das Hypophysenhormon FSH moduliert bzw. stabilisiert werden. FSH-Stimulation führt zu einer raschen signifikanten Induktion der CREM-Transkription (*Foulkes et al., 1993*). Außerdem wurde gezeigt, daß der Aktivator CREM $\tau$  in Ratten nach Hypophysektomie nicht mehr, nach Injektion von FSH jedoch erneut nachgewiesen werden konnte. Die Wirkung von FSH auf Keimzellen muß aber durch die Sertoli-Zellen vermittelt werden, da nur diese Zellen einen FSH-Rezeptor ausbilden (*Kliesch et al., 1992, Böckers et al., 1994*). Neuere Untersuchungen schränken die Bedeutung von FSH wieder ein. So zeigen Ratten und Java-Affen, bei denen die hypophysäre Gonadotropinsekretion durch eine Behandlung mit dem GnRH Antagonisten Cetrorelix unterdrückt wurde, keine signifikante Veränderung der CREM-Expression (*Behr und Weinbauer, 1999*). Auch der Mangel von CREM-Protein bei Männern mit Spermatidenarrest konnte nicht durch ein Fehlen von FSH erklärt werden, da alle untersuchten Patienten normale Serum-FSH-Werte aufwiesen. Ein Teil der Patienten besaß sogar eine erhöhte Serum-FSH-Konzentration (*Weinbauer et al., 1998, Steger et al., 1999*).

## 2.3 Störungen der Spermatogenese

### 2.3.1 Diagnose und Ätiologie

Ursachen des symptomatischen Bildes der männlichen Infertilität finden sich auf Ebene des Hypothalamus, der Hypophyse, des Hodens und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, der ableitenden Samenwege und des Penis. Desweiteren kommen hereditäre Ursachen in Frage (Hermaphroditismus, Kryptorchismus, Hodenektomie usw.). Die Infertilität kann auch als Begleiterscheinung von Allgemeinerkrankungen auftreten oder Folge einer Einwirkung von Umwelttoxinen oder physikalischer Faktoren (Hitzeinstrahlung) sein (*Schuppe et al., 1999*). Die am häufigsten diagnostizierte Ursache männlicher Fertilitätsstörungen stellt die Varikozele (Krampfadernbruch) dar (Inzidenz 16%, *Nieschlag, 1996*), wobei die kausale Beziehung zwischen Varikozele und testikulärer Störung bislang nicht eindeutig bewiesen werden konnte. An zweiter Stelle steht der Hodentumor (2,5%). Die vermehrte  $\beta$ -hCG-Sekretion durch das Tumorgewebe führt zu einem Absinken der FSH-Konzentration, die Tumorexpansion verursacht einen lokalen Temperaturanstieg und die Zerstörung der Blut-Hoden-Schranke. Hinzu kommen therapiebedingte Schäden (Chemo-, Radiotherapie). Bei etwa einem Drittel der Patienten stellt die Infertilität ein idiopathisches Geschehen dar (*Nieschlag, 1996*).

Spermatogenesestörungen führen bei Mensch und Tier unabhängig von ihrer Ursache zu quantitativ und qualitativ verminderter Spermienproduktion bzw. Azoospermie. Kennzeichen im Spermaprofil der zytologisch am häufigsten befundenen Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom) sind eine Samenzelldichte unter 20 Mio/ml (Oligozoospermie), ein Anteil beweglicher Spermien unter 50% (Asthenozoospermie) und ein Anteil morphologisch auffälliger Samenzellen über 30% (Teratozoospermie) (*WHO, 1993*). Bei histologischer Auswertung der meist im Anschluß durchgeführten Hodenbiopsie (*Bergmann und Kliesch, 1998*) zeigt sich typischerweise das Bild der bunten Atrophie, das heißt, man findet sowohl normale Spermatogenese als auch verschiedene Ausprägungen der Spermatogenesestörung bis hin zum totalen Arrest in unmittelbar benachbarten Samenkanälchen (*Sigg, 1979*).

Beim Menschen ist eine negative Korrelation des Serum-FSH-Spiegels mit der Spermienanzahl und eine positive mit dem Schweregrad einer Germinalzellaplasie (SCO-Syndrom; *Bergmann et al., 1994, Martin-du-Pan und Bischof, 1995, Yaman et al., 1999*) erkennbar. Da im Hoden nur die Sertoli-Zellen über einen FSH-Rezeptor verfügen (*Böckers et al., 1994*), ist der hohe FSH-Spiegel bei den Patienten auf undifferenzierte und daher

funktionsuntüchtige Sertoli-Zellen zurückzuführen. Ein geringerer Differenzierungsgrad ist an der Morphologie der Zellkerne zu erkennen (*Bruning et al., 1993*) sowie an der Expression präpuberaler Differenzierungsmarker wie Zytokeratin-18, Anti-Müller-Hormon und M2A-Antigen (*Miettinen et al., 1985, Paranko et al., 1986, Stosiek et al., 1990, Soosay et al., 1991, Bergmann und Kliesch, 1994, Rogatsch et al., 1996, Steger et al., 1996, Kliesch et al., 1997, Steger et al., 1999b*). Es wurde auch ein Mangel des Gap-junction-Proteins Connexin 43 (CX43), welches möglicherweise an der Differenzierung von Prä-Sertoli-Zellen in adulte Sertoli-Zellen beteiligt ist, beim Spermatogenese-arrest nachgewiesen (*Steger et al., 1999c*).

Beim Hengst sind Varikozelen (*Gygax et al., 1973*) und Hodentumoren ebenfalls beschrieben, treten aber sehr selten auf. Etwas häufiger findet man Entzündungen von Hoden, Nebenhoden oder akzessorischen Geschlechtsdrüsen in erster Linie traumatischen oder infektiösen Ursprungs. Auch Umweltfaktoren und Ernährung beeinflussen die Fertilität des Hengstes (*Dietz und Huskamp, 1999, Varner et al., 2000*).

Von Oligozoospermie spricht man beim Pferd bei einer Samenzelldichte unter 100000/ $\mu$ l; Grenzwerte für die Beweglichkeit liegen bei 45% (Nativsperma) und für den Anteil morphologisch veränderter Spermien bei 35% (*Gravance et al., 1997*).

### **2.3.2 Störungen der endokrinen Regulationsmechanismen**

Hormonelle Störungen treten auf Stufe des Hypothalamus, der Hypophyse und der Gonaden auf (*Behre et al., 1996, Behre und Nieschlag, 1998*). Primär sind meist Gendefekte für die Störung verantwortlich (*Robinson et al., 1991, Knoll et al., 1993*), sekundär kommen Hormonsekretionsstörungen durch Tumore im Bereich des Diencephalons hinzu (*Mehta et al., 1995*). Für den hypogonadotropen Hypogonadismus (Kallmann-Syndrom) und den isolierten FSH-Mangel (Pasqualini-Syndrom) sind die Ursachen noch nicht vollständig geklärt.

Auch beim Pferd sind verschiedene endokrine Störungen sowie deren Therapiemöglichkeiten, beispielsweise durch GnRH-Injektion, beschrieben worden (*Douglas et Umphenour, 1992, Brinsko, 1996*).

### 2.3.3 Störungen der genetischen Regulationsmechanismen

Für Störungen der Spermatogenese werden in erster Linie Mutationen bzw. DNA-Strangbrüche in fertilitätsrelevanten Genen verantwortlich gemacht, besonders im Falle der Azoospermie und bei schweren Oligozoospermien (*Tiepolo und Zuffardi, 1976, Vogt et al., 1992, Takiyama et al., 1993*). Ein Beispiel einer gonosomalen Chromosomenaberration stellt das Kallmann-Syndrom mit einem auf dem Chromosom Xp22.3 lokalisierten Defekt dar, welcher zu Hypogonadismus und Spermatogenese-arrest auf der Stufe von primären Spermatozyten führt (*Franco et al., 1991*). Ansonsten haben DNA-Strangbrüche auf dem X-Chromosom meist lethale Folgen, Strangbrüche auf dem Y-Chromosom sind Gegenstand aktueller Forschung. Deletionen der „sex-determining region of Y-chromosome“ (SRY-Region) resultieren in weiblichem Phänotyp mit Gonadendysgenese (*Sinclair et al., 1990*), Deletionen innerhalb der AZF-Region (Azoospermiefaktor, Multigenlokalus) führen zu Germinalzellaplasie (AZFa), Spermatogenese-arrest auf der Stufe von primären Spermatozyten (AZFb) (*Elliot et al., 1997*) oder quantitativ verminderter aber qualitativ intakter Spermatogenese (AZFc) (*Ma et al., 1993, Reijo et al., 1995, Cooke und Elliot, 1997*).

#### 2.3.3.1 Störungen der sequentiellen Expression von Kernproteinen in haploiden Spermatischen

Beim Menschen wurde schon frühzeitig unvollständig kondensiertes Kernchromatin in ejakulierten Spermatozoen als Ursache für Infertilität diskutiert (*Bedford et al., 1973, Dadoune et al., 1988*). Bald kam man zu der Erkenntnis, daß Protaminmangel in Spermatozoen zu Störungen der Chromatinkondensation führt (*Courtens und Loir, 1981, Dadoune et al., 1988, Blanchard et al., 1990, Bianchi et al., 1993, Lolis et al., 1996*). Inzwischen konnte man außerdem nachweisen, daß eine verfrühte Translation von Protamin-1-mRNA eine vorzeitige Chromatinkondensation und Arrest der Spermienentwicklung bei der Maus erzeugt (*Lee et al., 1995*).

Eine unvollständige Kondensation des Chromatins wird sowohl durch eine veränderte Zusammensetzung der Kernproteine (*Silvestroni et al., 1976, Chevaillier et al., 1987*) als auch durch ein irreguläres Verhältnis zwischen den Kernproteinen (*Balhorn et al., 1988, Belokopytova et al., 1993*) hervorgerufen. So ist der Protamingehalt dieser Spermien erniedrigt (*Lescoat et al., 1988, Blanchard et al., 1990, Sakkas et al., 1996*) und das Verhältnis Prm-1-/Prm-2-Protein erhöht (*Balhorn et al., 1987, Belokopytova et al., 1993, de*

*Yebara et al., 1998*), was auf eine verminderte Expression von Protamin-2 zurückgeführt wurde. Die Ergebnisse bezüglich des Protamingehaltes wurden durch *Steger et al. (2001c, 2003)* an runden Spermatiden auf mRNA-Ebene bestätigt. Das Verhältnis Prm-1-/Prm-2-mRNA erwies sich als entscheidender Faktor für die Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit von Spermien. Protamin1- bzw. Protamin2-haploinsuffiziente Mäuse sind steril (*Cho et al., 2001*). Sowohl die absolute Menge, wie auch das Verhältnis der Protamine zueinander sind somit von essentieller Bedeutung für die männliche Fertilität.

Weiterhin konnte man nachweisen, daß die Deletion der Ca<sup>2+</sup>/calmodulinabhängigen Proteinkinase-IV (CamKIV) eine Störung im Histon-Protamin-Austausch verursacht, welche wiederum auf dem verzögerten Austausch von Transitionsprotein-2 und einem spezifischen Verlust von Protamin-2 beruht (*Wu et al., 2000*).

Obgleich die Gene für Protamin-1 und Protamin-2 auf Chromosom 16p13.3 (Accession Z46940) gekoppelt sind, erscheint ihre Expression bei veränderter Spermatogenese nicht aneinander gebunden zu sein. Die fokale Reduktion von Prm-1- und Prm-2-mRNA im Tubulus mit Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden in direkter Nachbarschaft zu Tubuli mit zumindest qualitativ normaler Spermatogenese läßt lokale Unterschiede in der Präsenz von Regulationsfaktoren, welche für die korrekte Differenzierung runder Spermatiden in reife Spermatozoen verantwortlich sind, vermuten (*Steger et al., 2001c*).

### **2.3.3.2 Störungen der transkriptionalen und translationalen Regulation**

CREM ist für die Spermiodifferenzierung im Rahmen der Spermio-genese der Maus unabdingbar sei es zur Modulation der Transkription cAMP-responsiver Gene wie auch zur Regulation der Genexpression in Spermatiden (*Lalli et al., 1996, Monaco et al., 1996, Walker und Habener, 1996*). Männliche knock-out Mäuse, denen infolge homologer Rekombination ein funktionelles CREM-Gen fehlt, zeigen bei normaler Serum-FSH-Konzentration einen Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden und sind somit steril (*Blendy et al., 1996, Nantel et al., 1996*). Weibliche knock-out Mäuse dagegen sind völlig unauffällig. Im histologischen Bild erkennt man, daß sich die Spermatiden nicht über Stadium III des Keimepithelzyklus (runde step 3 Spermatiden) hinaus entwickeln und daher insgesamt nur wenige, oft multinukleäre runde Spermatiden und keinerlei Spermatozoen vorhanden sind. Außerdem ist eine massive Zunahme apoptotischer Keimzellen zu beobachten.



Hodenbiopsien von Männern mit Spermatidenreifungsdefekt gleichen histologisch denen der CREM knock-out Mäuse. Darüber hinaus zeigen die Patienten eine deutliche Reduktion oder sogar einen kompletten Ausfall sowohl auf Stufe von Tnp-1- und CREM-Protein (*Weinbauer et al., 1998*) als auch von Tnp-1- und CREM-mRNA (*Steger et al., 1999*). Insbesondere fällt ein völliges Fehlen von CREM-Aktivatorformen ( $\tau$ ,  $\tau\alpha$ ,  $\tau1$ ) in Hodenbiopsien wie auch im Ejakulat der Patienten auf (*Peri et al., 1998, Blöcher et al., 2003*). Auch bei Hengsten mit gestörter Spermatogenese findet man lediglich CREM-Repressoren (*Blöcher et al., 2003*). CREM-Protein tritt normalerweise mit zeitlicher Verzögerung zur CREM-mRNA und vor der Expression von Tnp-1 auf. Der Transkriptionsfaktor CREM ist in die Regulation der Genexpression von Tnp-1 involviert. Der Spermatidenreifungsdefekt beim Menschen ist neben genetischen Ursachen (*Martin-du-Pan und Campana, 1993*) zumindest teilweise auf einen Defekt der CREM- und Tnp-1-Genexpression bzw. einen mangelhaften post-meiotischen Switch von Repressor- zu Aktivator-Isoformen der CREM-Genexpression zurückzuführen. Es ist anzunehmen, daß bei CREM-Mangel Keimzellen verstärkt der Apoptose anheimfallen (*Sassone-Corsi, 2000, Peri und Serio, 2000*).

Bei Patienten mit gestörter Spermatogenese konnte man zusätzliche und inakkurat gespleißte CREM-Repressorisoformen aufzeigen (*Behr und Weinbauer, 2000*); außerdem ist vor Kurzem ein weiterer Aktivator (CREM $\tau2$ ,  $\gamma$ , 882 bp) sowie eine neue Spleiß-Variante CREMACH (Bib) identifiziert worden. Es wurde vermutet, daß in diesem Fall ungenaues Spleißen zur Produktion inaktiver Transkripte führte (*Behr und Weinbauer, 2000*).

Eine Störung der translationalen Kontrolle der Spermatogenese liegt bei männlichen knock-out Mäusen mit einem Defekt des Tarbp2-Gens, welches für das Protamin-1-mRNA-binding Protein (PRBP) kodiert, vor; diese sind ebenfalls steril (*Zhong et al., 1999*). PRBP bindet in der 3'UTR der Protamin-1-mRNA und unterdrückt dadurch deren Translation (*Lee et al., 1996*).

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Untersuchungsmaterial, Geräte und Chemikalien**

##### **3.1.1 Hodengewebe**

###### **3.1.1.1 Menschliches Hodengewebe**

Es wurden Hodenbiopsien 14 infertiler Männer im Alter zwischen 22 und 44 Jahren untersucht. Bei 10 Patienten, welche eine obstruktive Azoospermie nach Vasektomie aufwiesen, wurden die Biopsien für diagnostische Zwecke im Rahmen der Refertilisierung entnommen. Diese Proben dienten nach histologischer Bestätigung einer normalen Spermatogenese als Kontrollgruppe (Score  $\geq 8$ , *Bergmann und Kliesch, 1998*).

Bei 4 Patienten, die aufgrund einer nicht-obstruktiven Azoospermie vorstellig wurden, ergab die diagnostische histologische Untersuchung der Biopsieproben eine gestörte Spermatogenese mit komplettem Verlust der Spermatozoen aufgrund eines vollständigen Arrests der Spermatogenese auf der Stufe von runden Spermatiden.

###### **3.1.1.2 Hodengewebe vom Java-Affen**

Als Probenmaterial diente Hodengewebe von 4 erwachsenen geschlechtsreifen Tieren der Art *Macaca fascicularis* im Alter von 5-10 Jahren, welche zu Versuchszwecken gezüchtet worden waren und zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme keine krankhaften Befunde aufwiesen. Die Gewebeproben wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. G. F. Weinbauer (Covance Laboratories, Münster) zur Verfügung gestellt.

###### **3.1.1.3 Hodengewebe von der Maus**

Die Hoden von 4 Mäusen wurden einer Kontrollgruppe im Rahmen eines Tierversuchs entnommen, welcher nach den Richtlinien für biomedizinische Forschung mit Tieren durchgeführt worden war.

Weiterhin standen uns mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. E. Nieschlag (Institut für Reproduktionsmedizin Münster) die Hoden zweier CREM-knock-out Mäuse (Herstellung nach *Wistuba et al., 2002*) zur Verfügung.

#### **3.1.1.4 Hodengewebe vom Pferd**

Die im Zuge der Kastration entfernten, nicht pathologisch veränderten Hoden zweier gesunder geschlechtsreifer Hengste erhielten wir freundlicherweise von Prof. Dr. L.-F. Litzke (Chirurgische Veterinärklinik der JLU Gießen).

#### **3.1.1.5 Aufbereitung des Hodengewebes**

Ein Teil des Hodengewebes wurde tiefgefroren in Flüssigstickstoff zur Extraktion von RNA mit anschließender Durchführung einer Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Der andere Teil wurde in Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet gemäß standardisierter Technik. Anschließend wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte auf Aminopropyltriethoxysilan (APES) -beschichteten Objektträgern angefertigt und für die histologische Evaluierung mit Haematoxylin und Eosin gefärbt sowie direkt der *in-situ* Hybridisierung zugeführt.

Fixierung in Bouin'scher Lösung:

75ml gesättigte Pikrinsäure (25g Pikrinsäure+ 1l heißes Bidest, mind. 24h stehenlassen), 25ml 36%iges Formalin, 5ml Eisessig. Die Fixierungszeit beträgt ca. 24h.

Einbettung in Paraffin:

Gewebe jeweils 1-2h in 70%iges Ethanol (2mal), 80%iges Ethanol (2mal), 96%iges Ethanol (3mal), danach in Methylbenzoat 1/2/3 (1-4h/>24h/>24h) und zuletzt in Paraplast 1/2/3 (1-4h/2-12h/4-24h, jeweils bei 58-60°C) verbringen.

APES-Beschichtung der Objektträger (OT):

OT in Bidest, mit Aceton spülen und dieses abdampfen lassen. Dann OT 5min in 2%iges APES (*Sigma*) und 2min in Leitungswasser stellen, zuletzt nochmals 2min in Bidest. OT trocken und staubfrei lagern.

Herstellung von Paraffinschnitten:

Mit dem Mikrotom Paraffinblöckchen vorsichtig zu 5µm dicken Schnitten schneiden, diese mit einer Pinzette kurz in ein Wasserbad (37°C ) einlegen und danach plan auf den auf einer Heizplatte (37°C) ruhenden OT auftragen. Im Trockenschrank über Nacht bei 37°C lagern.

### **3.1.2 Geräte**

- Laborumlufttrockenschrank UT 12 (*Heraeus Instruments, Hanau*)
- Schüttler IKA-VIBRAX-VXR (*IKA-Labortechnik GmbH, Staufen*)
- Magnetrührer VARIOMAG Monotherm (*H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim*)
- Vortex-Mixer (*Heidolph, Kelkheim*)
- Heizplatte (*Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf*)
- Laborzentrifugen Universal 32R, Mikro 22R, Mikro 12-24 (*Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen*)
- Elektronische Analysenwaage AP250D (*OHAUS GmbH, Giessen*)
- Wasserbad (*Memmert GmbH, Schwabach*)
- T3 Thermocycler (*Biometra, Göttingen*)

### **3.1.3 Chemikalien**

#### **3.1.3.1 Gesamt-RNA-Extraktion**

- TRIzol-Reagent (*Life Technologies, Eggenstein*)
- RNase-AWAY Reagent (*Invitrogen, Karlsruhe*)
- DNase-I (*Promega, Mannheim*)
- 10x DNase-I-Puffer (0,1mol/l Tris-HCl+ 0,5mol/l KCl+ 15mmol/l MgCl<sub>2</sub> in DEPC- H<sub>2</sub>O)
- Trichlormethan (Chloroform)
- Isopropanol
- Ethanol 70%
- Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O, 1ml DEPC pro 1l Bidest)

#### **3.1.3.2 Reverse Transkription**

- Superscript-II Reverse Transkriptase (*Promega, Mannheim*)
- Oligo-dT-15 Primer (*Promega, Mannheim*)
- dNTPs (Nukleotid-Mix) 5mmol/l (*Promega, Mannheim*)
- 5x first strand buffer
- DEPC-H<sub>2</sub>O
- Dithiothreitol (DTT 0,1mol/l)

### 3.1.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Taq DNA-Polymerase (*Promega, Mannheim*)
- dNTPs (Nukleotid-Mix) 5mmol/l (*Promega, Mannheim*)
- 10x PCR-buffer2 (enthält 1,5mmol/l MgCl<sub>2</sub>)
- Primer für ACT (*MWG-Biotech, Ebersberg*)
  - forward primer (bp 438-461) 5'GAGTGGCAATTATTGTGTGCCATG3'
  - reverse primer (bp 783-761) 5'ACCCACCAAGGAGACAGAGCATT3'
- DEPC-H<sub>2</sub>O

### 3.1.3.4 Herstellung DIG-markierter cRNA-Sonden

- Restriktionsendonucleasen mit Pufferlösungen (*New England Biolabs, Frankfurt*)
  - *Nco*I (von *Nocardia corallina*)
    - Erkennungsregion: 5'C↓CATGG3'
    - 3'GGTAC↑C5'
  - *Not*I (von *Nocardia otitidis caviarum*)
    - Erkennungsregion: 5'GC↓GGCCGC3'
    - 3'CGCCGG↑CG5'
- RNA-Polymerasen (T7/SP6) (*Promega, Mannheim*)
- 10x DIG-RNA-Labeling-Mix (*Boehringer, Mannheim*)
- 5x Transkriptions-Puffer (*Promega, Mannheim*)
- EDTA-Lösung (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*)
- LiCl-Lösung (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*)
- Ethanol, 96% und 75%
- DEPC-H<sub>2</sub>O
- Dithiothreitol

### 3.1.3.5 In-situ Hybridisierung (ISH)

- Salmon Sperm DNA 10µg/ml (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*)
- Yeast t-RNA 10µg/ml (*Sigma, Steinheim*)
- RNaseA und RNaseT1 (*Sigma, Steinheim*)
- Proteinase-K (*Sigma, Steinheim*)
- Anti-DIG-Fab-Antikörper konjugiert an Alkalische Phosphatase (*Boehringer, Mannheim*)
- Nitro-Blue-Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-Indolylphosphate (NBT-BCIP)-
  - Entwicklerlösung (*DUNN, Gaithersburg, Maryland, USA*)

- Denhardt-Reagenz

(200mg BSA 2%+ 200mg Ficoll400 2%+ 200mg Polyvinylpyrrolidon 2%,  
in 10ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen)

- Pufferlösungen:

- 1x PBSM-Puffer, PBS=Phosphate buffered saline

(2 PBS-Tabletten (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*)+ 400ml DEPC-H<sub>2</sub>O  
+ 2ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung(1mol/l))

- 10x TNMT-Puffer

(121,1g Tris-HCl+ 58,4g NaCl+ 4,17g MgCl<sub>2</sub> in 1l Bidest (pH7,5)+ 1ml DEPC-H<sub>2</sub>O  
+ 5ml Triton-X-100)

- 5x NTB-Puffer

(60,5g Tris-HCl+ 29,2g NaCl in 1l Bidest (pH 9,6)+ 1ml DEPC-H<sub>2</sub>O, vor Gebrauch  
25ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung (1mol/l) pro 500ml 1x NTB-Puffer zugeben)

- 20x SSC-Stammlösung

(88,23g Natriumcitrat+ 175,29g NaCl in 1l Bidest (pH7,0)+ 1ml DEPC-H<sub>2</sub>O)

- BSA-Blockpuffer 3%, BSA=Bovine Serum Albumin

(6g BSA in 200ml 1x TNMT-Puffer)

- Alkoholreihe: 3x Xylol, 2x abs. Ethanol, 1x 96%iges Ethanol, 1x 70%iges Ethanol

- 1x0,2N HCl in DEPC-H<sub>2</sub>O

- MgCl<sub>2</sub>-Lösung 1mol/l

- Paraformaldehyd-Lösung 4% (pH 7)

- Dextransulfat 10%

- Deionisiertes Formamid 50%

- Levamisol-Lösung 1mol/l

- Glycerol 20%

- Glycin

- Essigsäure 20%

- DEPC-H<sub>2</sub>O

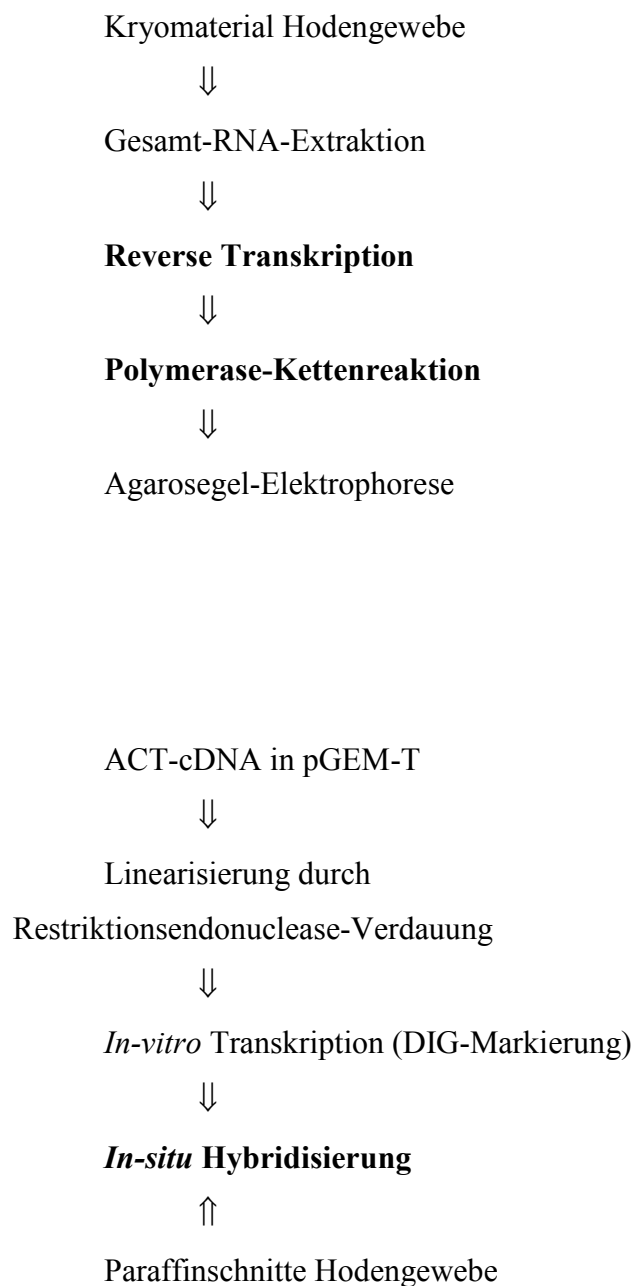
### **3.1.3.6 Agarosegel-Elektrophoresen**

- Agarose 1%
- 10x MOPS (41,8g MOPS+ 16,6ml 3M NaOAc+ 20ml 0,5M EDTA, pH7,0, DEPC-H<sub>2</sub>O ad 1l)
- 10xTAE (48,4g TRIS+ 11,4ml Essigsäure+ 20ml 0,5M EDTA, pH8,4, Bidest ad 1l)
- EDTA 0,5mol/l (186,1g EDTA+ 800ml DEPC-Wasser+ 20g NaOH-Plätzchen, pH8,0, DEPC-H<sub>2</sub>O ad 1l)
- Ethidiumbromid
- Bromphenolblau 1%
- Xylencyanol 1%
- Ficoll400
- Formalin 37%
- Glycerol
- Formamid
- DEPC-H<sub>2</sub>O (1ml DEPC pro 1l Bidest)

## 3.2 Untersuchungsmethoden

Zum Nachweis der ACT-mRNA im Hodengewebe wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt:

Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und *in-situ* Hybridisierung (ISH).





### 3.2.1 Gesamt-RNA-Extraktion aus Kryo-Material

#### Prinzip:

Die Extraktion von RNA gliedert sich in mehrere Einzelschritte, welche die Isolierung der Gesamt-RNA des Gewebes zum Ziel haben, das heißt in erster Linie der zum Nachweis der Genexpression entscheidenden mRNA, die hierbei nur einen Anteil von etwa 2% hat.

#### 1. Zellaufschluß und Inaktivierung zellulärer RNasen

Das Gewebe wird zunächst mittels Mörser und Pistill unter Flüssigstickstoff grob zerkleinert und anschließend mit dem Ultra-Turrax in TRIzol-Reagent homogenisiert. Die Kühlung in Flüssigstickstoff verlangsamt den RNA-Abbau durch RNasen. Guanidinthiocyanat, das in TRIzol enthalten ist, denaturiert und inaktiviert Proteine inklusive RNasen.

#### 2. Extraktion mit Phenol und Chloroform

Aufgrund seiner denaturierenden Eigenschaften auf Proteine (Ausfallen in der Interphase) reinigt Phenol das Gewebehomogenat von Verunreinigungen, während sich die DNA im sauren Milieu in Phenol löst und die RNA als wässriger Überstand übrigbleibt. Chloroform bewirkt neben einer Proteindenaturierung auch eine Konzentrierung, da es den Anteil der wässrigen Phase, die sich in der phenolischen löst, reduziert.

#### 3. Präzipitation mit Isopropanol und Waschen in Ethanol

Dieser Schritt führt zur Konzentration und Reinigung der separierten RNA und trennt Phenolreste, Glykoproteine, Proteoglykane und Polysaccharide ab. In Gegenwart einwertiger Kationen wie Natriumchlorid/-acetat, Ammoniumacetat oder Lithiumchlorid bildet RNA in Isopropanol einen unlöslichen Niederschlag. Anschließendes Waschen in 70%igem Ethanol entfernt die mitgefällten Salze wieder.

#### 4. Resuspension in DEPC-Wasser sowie Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

##### 4.1. Qualitativ

Mittels Agarosegel (Derivate von Ethidiumbromid) können schon geringe Mengen an Nukleinsäuren in Form von Banden sichtbar gemacht und damit bestimmt werden, ob die RNA intakt oder bereits degradiert ist. Zwei Banden für die 18S und 28S rRNA weisen auf eine intakte RNA-Präparation hin.

#### 4.2. Quantitativ

Die Messung der optischen Dichte (OD) mittels Absorptionsspektrometrie bei einer Wellenlänge von 260nm ist ein Mittel zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen.

Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich über die Formel

$$c(\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \cdot V \cdot F \quad \text{mit } \text{OD}_{260} 1 = 33 \mu\text{g RNA/ml}$$

c= Nukleinsäurekonzentration, V= Verdünnungsfaktor, F= Multiplikationsfaktor (40).

Da DNA und RNA spektrometrisch nicht voneinander zu unterscheiden sind, muß es sich, zur Treffung einer eindeutigen Aussage, um eine reine DNA- oder RNA-Lösung handeln. Zudem mißt das Photometer nur zuverlässig in einem Bereich zwischen 0,1-1OD (Mindestgehalt an RNA: 0,25µg/ml).

Die Reinheit der Präparation, d.h. die Freiheit von Proteinkontaminationen, wird anhand des Verhältnisses  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  überprüft, welches zwischen 1,5 und 2,0 liegen sollte.

#### **Versuchsdurchführung:**

Nach Vorbereitung eines RNase-freien Arbeitsplatzes (mit abs. Ethanol und RNase-AWAY Reagent reinigen) und ebensolcher Arbeitsmaterialien (in Alufolie verpackt 4h bei 180°C im Sterilisator erhitzen) sowie Ansetzen aller Lösungen mit dem RNase-Inhibitor DEPC und Autoklavieren, wurde das gefrorene Hodengewebe in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Porzellanschale gemörsert und ca. 100mg des Gewebes in ein 2ml Tube mit 1ml TRIzol Reagent überführt. Anschließend erfolgte die Homogenisation im Ultra-Turrax, 5min Inkubation bei Raumtemperatur (RT), Zugabe von 200µl Chloroform und erneutes Stehenlassen für 5min. Nun wurde 15min bei 4°C zentrifugiert.

Als Ergebnis erhielt man ein dreiphasiges Gemisch:

eine obere farblose wässrige Phase bestehend aus RNA und DNA, eine weiße Interphase sowie eine untere rote organische Phase mit denaturiertem Protein.

Zum Zwecke der Präzipitation wurde als nächster Schritt die obere Phase (RNA/DNA) abpipettiert und zu gleichen Teilen mit Isopropanol in ein neues Tube verbracht, vorsichtig gemischt und 30min bei -20°C inkubiert. Nach 10minütigem Zentrifugieren bei 4°C erhielt man ein Pellet, welches nun zwei mal in 70%igem Ethanol in DEPC-Wasser (500µl, -20°C) gewaschen und nach 10min Ruhen im Eiswasser erneut zentrifugiert wurde.

Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 50µl DEPC-Wasser bei 70°C resuspendiert.

Bestimmung von Konzentration und Reinheit des extrahierten RNA-Materials:

Auf 1%igem RNA-Agarose-Gel (Ethidiumbromidzusatz) zeigten sich 2 Banden für 18S und 28S rRNA. Die erforderlichen Kriterien bezüglich photometrisch (OD260) ermittelter Reinheit  $OD_{260}:OD_{280} = 1,5-2,0$  wurden erfüllt.

Zur Abtrennung von evtl. vorhandener genomischer DNA wurde vor der Reversen Transkription noch ein DNase-I-Verdau zwischengeschaltet:

15µg RNA + 30U DNase-I + 2µl 10xDNase-I-Puffer + DEPC-Wasser ad 20µl

Inkubation: 30min bei 37°C, danach 10min bei 72°C.

### 3.2.2 Reverse Transkription

#### Prinzip:

Die Reverse Transkription bezeichnet die Herstellung einer „copy DNA“ aus mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase. Im vorliegenden Fall dient die cDNA-Synthese mit nachfolgender PCR (two-step-RT-PCR) als Nachweis der ACT-mRNA-Expression im Hodengewebe.

Generell werden zunächst RNA und Primer zusammenpipettiert und auf 70°C erhitzt, wodurch die Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst werden. Beim Abkühlen auf Eis hybridisieren die Primer mit der mRNA, danach fügt man Puffer, Nukleotide, RNase-Inhibitor und Reverse Transkriptase hinzu und inkubiert.

- Primer: Zur Anwendung kamen Oligo-dT-Primer aus 15 Basen, welche an den Poly-A-Schwanz am 3'Ende der mRNA binden und somit zur Synthese kompletter cDNAs von Poly-A-Schwanz bis 5'Ende der mRNA herangezogen werden können.
- RNA: Es wurde die in 3.2.1 extrahierte Gesamt-RNA eingesetzt; durch die Oligo-dT-Primer wird ausschließlich mRNA in cDNA umgeschrieben.
- Reverse Transkriptase: Durch die Superscript-II-Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ohne DNA-Exonuclease- und intrinsische RNase-H-Aktivität, sind deutlich längere Transkripte möglich. Da diese für die Initiation der DNA-Synthese eine doppelsträngige Matrize benötigt, wird ein Oligo-dT-Primer eingesetzt, der an den Poly-A-

Schwanz der einsträngigen RNA bindet. Dann synthetisiert die Transkriptase in Gegenwart von Desoxynukleotid-Triphosphaten einen komplementären cDNA-Strang.

#### **Versuchsdurchführung:**

Die cDNA-Synthese erfolgte durch Reverse Transkription des aus der RNA-Extraktion erhaltenen RNA-Materials unter Verwendung der Superscript-II-Reversen Transkriptase.

In angegebener Reihenfolge wurden folgende Substanzen in einem Tube zusammenpipettiert:

8µg RNA + 1µl Oligo-dT-15 Primer + DEPC-Wasser ad 12µl

Inkubation: 10min bei 70°C, danach 3min in Eiswasser

Zugabe von

4µl 5x first strand buffer + 1µl Nucleotid-Mix + 2µl DTT

Inkubation: 1min bei 37°C

Zugabe von

1µl Superscript-II-Reverse Transkriptase

Inkubation: 1h bei 37°C

### **3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

#### **Prinzip:**

Generell besteht jedes PCR-Programm aus drei Schritten, welche einen Zyklus bilden, der dann mehrmals wiederholt wird (vgl. Abb.13 und 14).

#### **1. Denaturierung**

Die doppelsträngige DNA wird in einer Lösung mit den Primern, den dNTPs, dem Reaktionspuffer und einer hitzestabilen DNA-Polymerase durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Dabei ist die Denaturierungsphase so gering wie möglich zu halten, um Schädigungen zu vermeiden.

## 2. Annealing

Die im Überschuß vorhandenen Oligonukleotidprimer binden bei Absenkung der Temperatur auf 37-65°C (abhängig von der Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer) an die einzelsträngige Template-DNA.

Die Schmelztemperatur,  $T_m$  (Temperatur, bei der 50% des Primers nicht mehr an das Template bindet) wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$T_m = 4 \cdot (\text{Anzahl G+C}) + 2 \cdot (\text{Anzahl A+T}).$$

Die Annealing-Temperatur ist 5°C tiefer zu wählen.

## 3. Elongation

Nun wird die Temperatur auf 72°C erhöht, das Arbeitsoptimum der Taq DNA-Polymerase, welche die Primer verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Weil die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, verdoppelt ein Zyklus die Zahl der Template-DNAs. In der letzten Runde verlängert man den Polymerisationsschritt um mehrere Minuten, um alle Stränge bis zum Ende zu synthetisieren. Die Elongationszeit ist von der Länge des zu erwartenden Produktes abhängig, wobei bei der Taq-Polymerase etwa 0,5-1min je kb Länge zu veranschlagen ist.

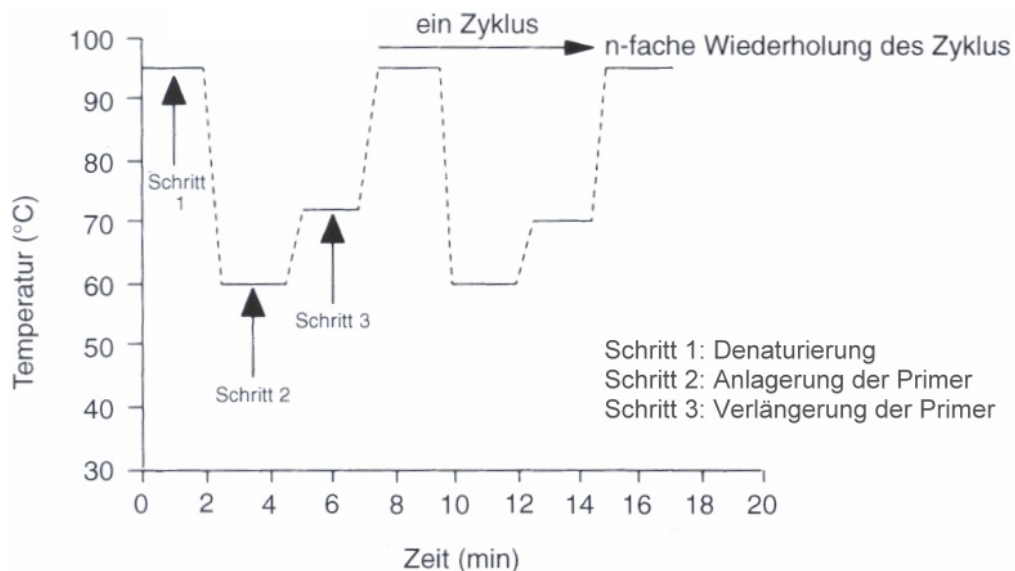


Abb.13 Zyklischer Temperaturverlauf der PCR (Newton und Graham, 1994).

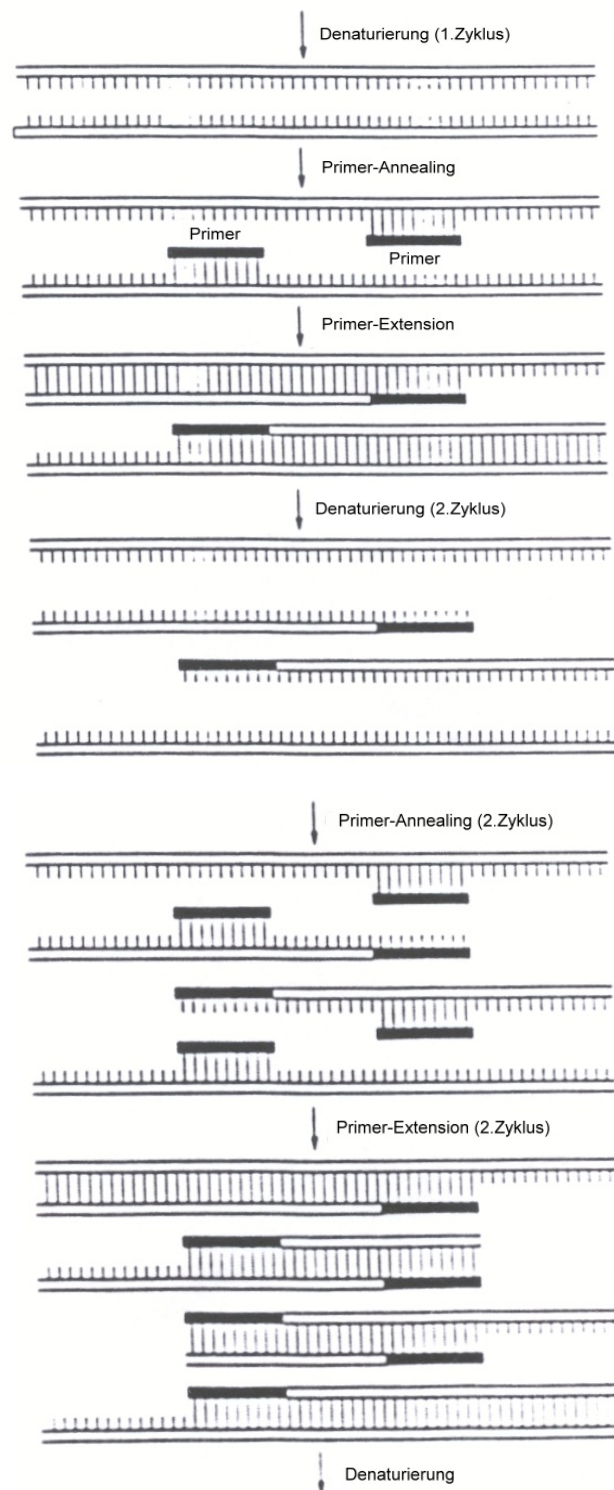


Abb.14 Schema des PCR-Verlaufs (modifiziert nach *Mülhardt, 2002*).

- Das Template: Im Falle der RT-PCR wird aus mRNA durch Reverse Transkription zunächst cDNA hergestellt und diese dann als Template für die PCR genutzt. Bezüglich der Menge sollten mindestens 10000 Template-DNA-Moleküle veranschlagt werden, das entspricht in etwa der cDNA von 1µg Gesamt-RNA.
- Der Puffer: Der verwendete Puffer sollte den pH in einem Bereich oberhalb von 8 halten, dem Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase (z.B. Tris-Puffer mit pH 8,5 oder 9,0).
- Die  $MgCl_2$ -Konzentration:  $Mg^{2+}$  (im Puffer enthalten) beeinflusst Primerannealing, Enzymwirkung, Produktspezifität, Trennung der Stränge bei Denaturierung, Primerdimerbildung und Fehlerrate. Die optimale Konzentration liegt gewöhnlich zwischen 0,5 und 2,5mM, je nach Primer, Nukleotid- und EDTA-Menge.
- Die Primer: Die sequenzspezifischen gegenläufig orientierten Primer ersetzen die Oligo-dT-Primer aus der Reversen Transkription, sie bestimmen Spezifität und Sensitivität der PCR. Meist besitzen sie eine Länge von 17-30 Nukleotiden und einen Anteil von 40-60% Guanin- und Cytosinbasen. Die Schmelztemperatur sollte im Bereich von 55-80°C liegen und für beide Primer möglichst gleich sein. Um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu umgehen, dürfen nicht mehr als vier gleiche aufeinanderfolgende Basen und keine ungewöhnlichen Basenabfolgen (lange G/C-Abschnitte) verwendet werden, außerdem sollten am 3'Ende weder T noch mehrere G oder C sitzen. Interne Sekundärstrukturen der Primer wie beispielsweise Haarnadeln müssen ebenso vermieden werden wie das Hybridisieren der Primer untereinander durch eine Komplementarität an ihren 3'Enden.
- Die Taq-Polymerase: Die aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isolierte Polymerase hat ihr Aktivitätsmaximum bei einer Temperatur von 74°C (pH>8) und besitzt neben der templateabhängigen sowie –unabhängigen 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-, aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Im Regelfall hängt sie templateunabhängig ein überstehendes Adenosin an das 3'-Ende ihrer Produktstränge.

### **Versuchsdurchführung:**

PCR-Mastermix als 50µl Ansatz:

37,5µl DEPC-Wasser

5µl 10x PCR-buffer2 (inkl.  $MgCl_2$ )

1µl Nukleotidmix

1µl forward primer + 1µl reverse primer

4µl cDNA

0,5µl Taq DNA-Polymerase

Definition der jeweiligen Temperaturbedingungen der 3 Schritte jedes Zyklus:

- ◆ Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Hitze (Schritt 1= 95°C)
- ◆ Annealing der Oligonukleotidprimer an die denaturierte Matrize bei Absenkung der Temperatur in deren optimalen Wirkungsbereich (Schritt 2= 58°C)
- ◆ Elongation durch die hitzestabile DNA-Polymerase (Schritt 3= 72°C).

Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt:

1x 95°C für 2min, 40x (95°C für 45sek, 58° für 45sek, 72°C für 45sek), 1x 72°C für 8min.

Letztlich erhielt man ein ACT-Amplifikationsprodukt von 346bp Länge (Accession AF278541).

Als interne Kontrolle der Integrität der RNA im Gewebe diente ein 202bp Amplifikationsprodukt des  $\beta$ -Actin-Gens unter Verwendung der Primer 5'CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG3' (forward bp 867-888) und 5'GGAGCAATGATCTTGATCTTC3' (reverse bp 1068-1048).

### 3.2.4 Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter cRNA-Sonden

#### Prinzip:

Die Hybridisierung einer Nukleinsäureprobe (cRNA-Sonde) an endogene mRNA im histologischen Präparat erlaubt den Nachweis spezifischer mRNA auf zellulärer Ebene.

Die Markierung der cRNA-Sonde erfolgte im Rahmen der Transkription durch Digoxigenin (DIG), ein pflanzliches Steroid aus *Digitalis lanata* und *D. purpurea*, welches als körperfremde Substanz nicht in den zu untersuchenden Geweben vorkommt. Die Markierung wird von einem spezifischen Antikörper gegen DIG erkannt, an den das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist, welches sich über die enzymatische Umsetzung von 5-bromo-4-chloro-3-Indolylphosphate (BCIP) und Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT) nachweisen läßt.

Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden (siehe dazu Abb.15):

1. Klonierung
2. Plasmidextraktion
3. Restriktionsendonuclease-Verdauung
4. *in-vitro* Transkription



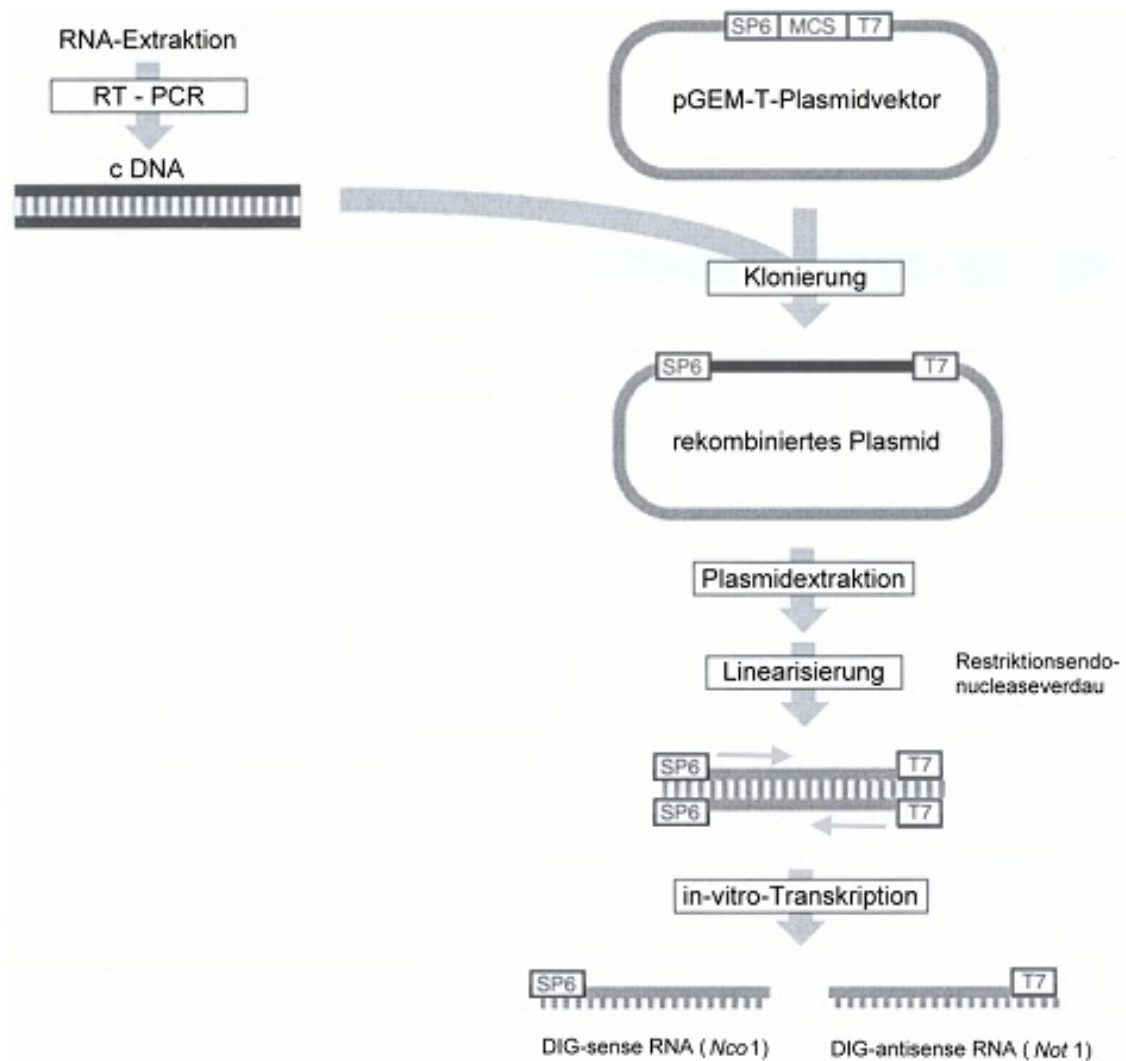


Abb.15 Prinzip der Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden (modifiziert nach *Mülhardt, 2002*). Im Rahmen meiner Dissertation wurde mir das Plasmid samt ACT-Insert von unserem Labor zur Verfügung gestellt.

Zunächst muß das gewünschte DNA-Fragment im Rahmen der Klonierung in die multiple cloning site (MCS) eines Vektors ligiert werden, die von zwei RNA-Polymerase-Bindungsstellen flankiert wird. Im Falle des pGEM-T-Plasmidvektors wird die MCS von den RNA-Polymerasepromotoren SP6 und T7 flankiert.

Nach erfolgter Plasmidextraktion schneidet man den Plasmidvektor mit Restriktionsenzymen. Man erhält dadurch lineare rekombinante Plasmide, welche bei der Umschreibung RNAs definierter Länge liefern und die Transkription von Vektorsequenzen ausschließen. Das

Restriktionsenzym sollte keine 3'Überhänge erzeugen, die ebenfalls als Startpunkt für die RNA-Polymerase dienen könnten. Die für den Restriktionsendonuclease-Verdau gewählten Enzyme *NotI* und *NcoI* produzieren lineare antisense- und sense-Proben mit überhängenden 5'Enden.

Bei der abschließenden *in-vitro* Transkription synthetisiert die jeweilige promotorspezifische RNA-Polymerase anhand der DNA-Matrize einzelsträngige DIG-gebundene-sense-cRNA (*NcoI*)- und DIG-gebundene-antisense-cRNA (*NotI*)-Sonden.

### 3.2.4.1 Restriktionsendonuclease-Verdauung

#### **Prinzip:**

Sinn der Restriktionsendonuclease-Verdauung ist die Linearisierung des rekombinierten Plasmids. Sie erfolgt in Bezug auf den gewählten Promotor (SP6 bzw. T7) stromabwärts von der Fremd-DNA. So werden sog. „run around“ Transkripte vermieden, RNA-Proben, welche den gesamten Vektor umlaufen.

Restriktionsendonucleasen des Typs II erkennen mit hoher Spezifität 4-8 Basenpaare in einem DNA-Strang und schneiden präzise nur ihre Zielsequenz (meist 4-, 6-oder 8-cutter). Die Erkennungssequenzen sind in der Regel Palindrome. Die geschnittenen Fragmente besitzen ein 5'Phosphat- und ein 3'OH-Ende, wobei die Enden entweder glatt (blunt) bei symmetrischer Hydrolyse oder überstehend (sticky) mit 5'Überhang oder 3'Überhang (meist 2 oder 4 Basen) infolge asymmetrischen Schneidens sind. Die von uns gewählten Endonucleasen *NotI* und *NcoI* erzeugen einen 5'Überhang, so ist eine unspezifische Bindung der RNA-Polymerasen an freie 3'Enden nicht möglich.

Für den Standardverdau setzt man 0,2-1µg DNA ein, da bei geringeren Mengen eventuell die Nachweisgrenze des Ethidiumbromid-Agarosegels unterschritten werden könnte (10-20ng DNA je Bande), bei zu großen Mengen jedoch die Gefahr bestünde, das Gel zu überladen (wolkenartige Flecken statt Banden ab 0,3-1µg je Bande). Das Volumen des Ansatzes beträgt 20µl.

**Versuchsdurchführung:**

Zur Herstellung von linearen Sense- und Anti-Sense-Proben aus dem extrahierten Plasmid wurde ein Standardverdau mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *NotI* durchgeführt.

Ansatz:

12 µl DEPC-Wasser

5 µl Plasmid mit ACT-Insert

1 µl Restriktionsendonuclease (*NcoI* oder *NotI*)

2 µl Enzympuffer

Inkubation: über Nacht bei 37°C, danach Hitzeinaktivierung

Kontrolle auf Agarosegel

**3.2.4.2 In-vitro Transkription****Prinzip:**

Für die Transkription werden linearisierte Plasmid-DNA (getrennt für antisense- und sense-DNA), Puffer, DTT, DIG-markierte Nukleotide und RNA-Polymerase zusammenpipettiert und 1h inkubiert. In Gegenwart der Digoxigenin-markierten-Nukleotidtriphosphate synthetisiert die jeweilige promotor-spezifische RNA-Polymerase (SP6 bzw. T7) anhand der DNA-Matrize in 5'→3' Richtung einzelsträngige markierte RNA-Transkripte definierter Länge und Sequenz. Nach Reaktionsende wird die DNA-Matrize durch RNase-freie DNase abgebaut.

**Versuchsdurchführung:**

Gemäß folgender Anleitung wurde der Versuchsansatz in ein Tube pipettiert:

2 µl Plasmid aus dem Restriktionsendonucleaseverdau

2 µl RNA-Polymerase (T7 oder SP6)

2 µl 10x DIG-RNA-Labeling-Mix

4 µl 5x Transkriptionspuffer

2 µl 100x DTT

8 µl DEPC-Wasser

Inkubation: 1h bei 37°C

Zugabe von

0,5 µl 0,5mol/l EDTA-Lösung

1,2µl 8mol/l LiCl-Lösung

70,7µl 96%iges Ethanol (-20°C)

Inkubation: 1h bei -80°C

danach Zentrifugation 20min bei 4°C (Überstand abpipettieren)

Zugabe von 200µl 75%iges Ethanol (-20°C)

danach Zentrifugation 15min bei 4°C (Überstand abpipettieren)

Das erhaltene Pellet wurde zunächst getrocknet und danach bei 70°C in 50µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Vor der ISH wurde noch ein DNase-I-Verdau zwischengeschaltet (vgl. Kap.3.2.1).

### **3.2.5 *In-situ* Hybridisierung (ISH)**

#### **Prinzip:**

Hybridisierung bezeichnet die reversible Bildung eines Duplexmoleküls aus zwei komplementären Nukleinsäuresträngen. Die ISH soll die zeitliche und räumliche Genexpression des ACT im Keimzellepithel des Hodens anhand des Vorliegens von ACT-mRNA in der in einem spezifischen Stadium befindlichen Keimzelle unter Zuhilfenahme Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden nachweisen.

Im Einzelnen unterscheidet man 5 Schritte:

#### **1. Gewebeprebehandlung**

Dieser Schritt dient der Unterdrückung unspezifischer Hybridisierungen der Sonde mit Fremdsequenzen und ebensolcher Wechselwirkungen mit Proteinen und anderen Zellbausteinen. Desweiteren soll das Eindringen von Sonde und Nachweisreagenzien in das Gewebe erleichtert und die Zielsequenz stabilisiert werden.

Zunächst wird der Gewebeschnitt durch Xylol entparaffiniert, wobei die Einhaltung der angegebenen Zeiten für eine vollständige Entparaffinierung unbedingt erforderlich ist, und durch Ethanol unterschiedlicher Konzentration rehydriert.

Zur Gewebepерmeabilisierung wird ProteinaseK eingesetzt und die Reaktion abschließend mit Glycinlösung abgestoppt. Bei zu langer Inkubation können die Zellstrukturen irreversibel zerstört werden.

Mit Hilfe von 20%iger Essigsäure blockiert man unspezifische Hintergrundreaktionen durch endogene alkalische Phosphatase, die Nachfixierung erfolgt mit 4%iger Paraformaldehydlösung.

## 2. Prähybridisierung

Durch 20%iges Glycerin in DEPC-Wasser erreicht man eine zusätzliche Blockade unspezifischer Reaktionen.

## 3. Hybridisierung

Indem man die Schnitte auf ca. 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abschreckt, wird die Gewebe-mRNA (Zielsequenz) denaturiert, gestreckt und so stabilisiert.

Das Sondengemisch aus DIG-cRNA, Salmon-Sperm-DNA (Blockade-DNA, die unspezifisch an einzelne repetitive Sequenzen bindet, welche durch Erzeugung von Störsignalen zu einer unerwünschten Bindung der Sonde führen könnten), Yeast-t-RNA (Blockade-t-RNA) und DEPC-Wasser wird bei 70°C denaturiert und in Eiswasser abgeschreckt. Die Denaturierung durch Erhitzung der Sonden 30°C über ihren errechneten Schmelzpunkt(\*) hinaus ist erforderlich, um aus doppelsträngigen Nukleinsäuresequenzen einzelsträngige zu erzeugen an welche dann die RNA-Sonden binden können.

Der Hybridisierungspuffer aus 20x SSC, DEPC-Wasser, Denhardt-Reagenz (hemmt Hintergrundreaktionen), Dextransulfat (erhöht die Hybridisierungsgeschwindigkeit auf das Dreifache durch Bildung einer Matrix in der es zu einer lokalen Konzentration der Sonde kommt) und Formamid (senkt erforderliche Reaktionstemperatur in einen nicht gewebeschädigenden Bereich und destabilisiert Nukleinsäuren durch Hemmung der Wasserstoffbrückenbildung) kann ohne Vorbehandlung zu dem Sondengemisch pipettiert werden.

Sondengemisch und Puffer gibt man direkt auf die Schnitte und inkubiert in feuchter Kammer (50% Formamid) bei 37°C.

\*Schmelztemperatur  $T_m$ : Temperatur, bei der die Hälfte der doppelsträngigen Moleküle in Einzelstränge dissoziiert ist (bestimmt Stabilität von Nukleinsäure-Doppelsträngen).

## 4. Posthybridisierung

Durch stringentes Waschen erfolgt die Ablösung locker gebundener, nicht optimal hybridisierter RNA-Moleküle, was wiederum unspezifische Hintergrundsignale vermindert;

hierbei kann man durch Erniedrigung der Ionenstärke der Waschlösung die Spezifität der Reaktion erhöhen.

Die Stringenz mit der man die ISH durchführt, bestimmt den ungefähren Anteil korrekt gepaarter Nukleotide zwischen Sonde und Zielsequenz und kann über die Gleichung  $\text{Stringenz in \%} = 100 - M_f (T_m - T_a)$  mit  $M_f$  (Fehlpaarungsfaktor),  $T_m$  (Schmelztemperatur) und  $T_a$  (Hybridisierungstemperatur) berechnet werden. Sie ist abhängig von der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration helixstabilisierender Moleküle. Mit abnehmender Stringenz erhöht sich die Anzahl der Basenfehlpaarungen, unter zu stringenten Bedingungen können sich auch die Sonden lösen.

## 5. Immunhistochemie

Zuletzt erfolgt die Inkubation mit einem Anti-DIG-Fab-Antikörper, an den das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist (Abb.16). Mit Levamisol werden unspezifische enzymatische Reaktionen blockiert, bevor die Detektion an die Sonde gebundener Antikörper über Umsetzung der chromogenen Substrate BCIP (5-bromo-4-chloro-3-Indolylphosphate) und NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium) durch das Enzym Alkalische Phosphatase erfolgt. Nach ca. 4-6h erkennt man ein bläulich-rotes Reaktionsprodukt, welches durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin hervorgehoben werden kann. Danach deckt man die Schnitte mit Glycergel ein und beurteilt sie unter dem Lichtmikroskop.

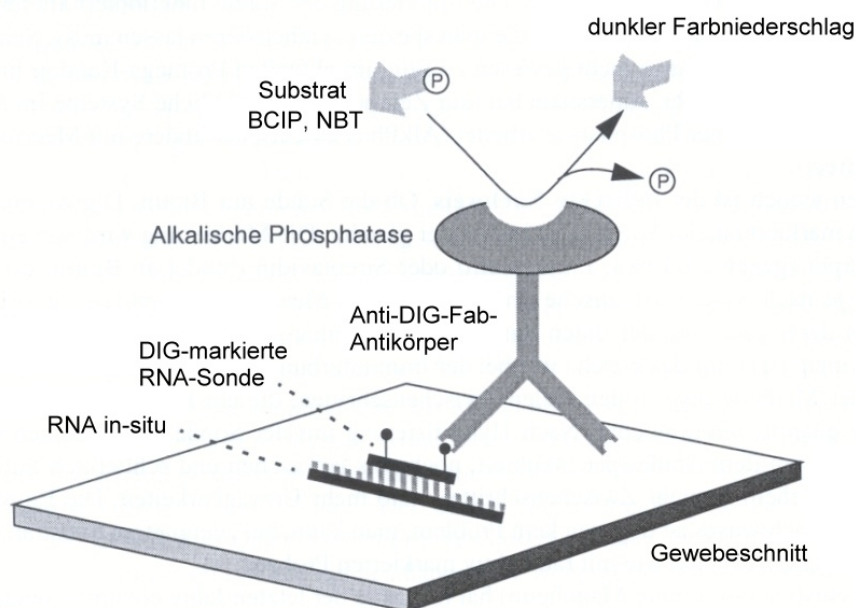


Abb.16 Prinzip des indirekten nicht-radioaktiven Nachweises über DIG (modifiziert nach Mülhardt, 2002).

### **Versuchsdurchführung:**

Bei jedem Test wurden neben der Hybridisierung mit DIG-cRNA Antisense-Proben parallel Negativkontrollen mit DIG-cRNA Sense-Proben durchgeführt.

#### **1.Tag (Gewebevorbehandlung, Prähybridisierung, Hybridisierung)**

Zum Entparaffinieren der 5µm dicken Hodenschnitte, welche zuvor über Nacht bei 60°C in den Trockenschrank gestellt worden waren, kam eine Alkoholreihe zur Anwendung.

1x5min Xylol (60°C), restliche Inkubationen bei Raumtemperatur:

2x5min Xylol, 2x5min abs. Ethanol, 1x kurz in 96% Ethanol eintauchen, 1x5min 70% Ethanol, 1x kurz in DEPC-Wasser stellen, 1x20min 0,2N HCl.

Danach wurden die Objektträger 15min in 2x SSC-Puffer (70°C) verbracht und in PBSM-Puffer gespült.

15µl Proteinase K und 2985µl PBSM-Puffer wurden vermischt und jeweils ca. 70µl davon auf jeden der Schnitte verteilt. Die Inkubation in der feuchten Kammer erfolgte 23min bei 37°C im Trockenschrank.

Danach wurde die Reaktion durch 0,2%ige Glycinlösung abgestoppt (5min) und die Objektträger nacheinander in 20%ige Essigsäure (15sec, 4°C), PBSM-Puffer (1x10sec, 1x5min), 4%ige PFA-Lösung (10min) und PBSM-Puffer (10sec) gestellt.

Die Prähybridisierung erfolgte in 20%igem Glycerin in DEPC-Wasser (30-60min, Raumtemperatur).

Für die Hybridisierung bereitete man getrennt Sondengemisch und Hybridisierungspuffer zu:

Sondengemisch (8µl Salmon-Sperm-DNA, 16µl Yeast-t-RNA, 16µl DIG-cRNA-Sonde als Sense-cRNA(*Nco*I)- oder Anti-Sense-cRNA(*Not*I)-Ansatz, Sondenverdünnung 1:100)

Hybridisierungspuffer (112µl DEPC-Wasser, 80µl 2x SSC, 8µl Denhardt-Reagenz, 400µl 50%iges deionisiertes Formamid, 160µl 10%iges Dextransulfat)

Nach sorgfältigem Vermischen wurde die Lösung für 10min im Wasserbad auf 70°C erhitzt und danach 5min in Eiswasser abgekühlt.

Die Schnitte selbst kamen für 10sec in 2x SSC, 10 min auf eine 70°C erhitzte Heizplatte und auf ein Kühlakku, bevor sie in die Hybridisierungskammer (Kleenex getränkt mit 200ml Formamid, 40ml 2xSSC und 160ml DEPC-Wasser) verbracht wurden.

Als letzten Schritt pipettierte man ca. 50µl des Sonden-Puffer-Gemisches auf jeden Objektträger, überschichtete mit einem sterilen Deckglas und inkubierte über Nacht bei 37°C.

## 2.Tag (Posthybridisierung, Immunhistochemie)

Die Posthybridisierung wurde durch wiederholte Spülungen der Objektträger in einer SSC-Puffer-Verdünnungsreihe in verschiedenen temperierten Wasserbädern durchgeführt:

4x10min 4x SSC (42°C), 15min 2x SSC (60°C), 15min 0,2x SSC (42°C), 5min 0,1x SSC (Raumtemperatur), 5min 2x SSC (Raumtemperatur).

Die Immunhistochemie erfolgte mit Anti-DIG-Fab-Antikörpern.

Dazu verbrachte man die Schnitte 10min in 1x TNMT (Raumtemperatur) und danach 1h in 3%igem BSA-Blockpuffer (Raumtemperatur).

Nun stellte man ein Gemisch aus 666µl 1x TNMT, 333µl 3%igem BSA in 1x TNMT und 2µl Anti-DIG-Fab-Antikörper her und pipettierte ca. 50µl davon auf jeden Objektträger, um diese danach in der Hybridisierungskammer bei 4°C über Nacht zu inkubieren.

## 3.Tag (Immunhistochemie-Fortsetzung)

Man stellte die Präparate bei Raumtemperatur nacheinander in 1x TNMT-Puffer (2x10min), 1x NTB-Puffer (5min) und 1x NTB+ 1ml 1M Levamisol (5min).

Daraufhin erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch NBT-BCIP-Lösung, welche man auf die Schnitte auftröpfte und letztere dann in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubierte. Die Inkubationsdauer variierte in Abhängigkeit von Dicke und Spezies des Hodengewebepräparates und mußte durch Musterung im Mikroskop individuell festgelegt werden. Sie betrug jedoch mindestens 4h.

Danach wurden die Objektträger nochmals 5min in 1x NTB+ 1ml 1M Levamisol verbracht und in Aqua bidest abgewaschen. Zur besseren Abgrenzung des rötlich gefärbten Reaktionsproduktes gegen das restliche Gewebe wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin angewandt (10-120 sec Einwirkzeit).

Zuletzt deckte man die Präparate in Glycergel ein und beurteilte das Ergebnis im Lichtmikroskop.

Kontrolle der erfolgreichen Blockade unspezifischer Hintergrundreaktionen durch endogene Alkalische Phosphatase: der Versuchsansatz wird ohne Zugabe der Anti-DIG-Fab-Antikörper (gekoppelt an Alkalische Phosphatase) durchgeführt. Es darf keine Farbreaktion durch enzymatische Umsetzung der Substrate BCIP und NBT erfolgen.



### 3.2.7 Agarosegel-Elektrophoresen

#### Prinzip:

Bei der Elektrophorese nutzt man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld zur Trennung komplexer Gemische von Biomolekülen bzw. zur Überprüfung ihrer Einheitlichkeit aus.

Agarosegele stellt man durch Schmelzen von Agarose in einem Laufpuffer und anschließendes Ausgießen in entsprechende Apparaturen her, wobei durch Eintauchen von Kämme in die Agaroselösung Taschen zum Einfüllen von DNA- bzw. RNA-Lösungen erzeugt werden. Bei Anlegen einer elektrischen Spannung an das Gel wandert die unter dem pH des Laufpuffers negativ geladene DNA bzw. RNA in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist in der Regel proportional zur angelegten Spannung. Standardgele besitzen Agarosekonzentrationen zwischen 0,5-2%, das deckt Fragmentgrößen von 0,5-20kb ab.

- Molekülgröße der DNA/RNA und Gesamt-Nettoladung

Große Moleküle wandern aufgrund stärkerer Reibungskräfte langsamer durch die Poren der Gel-Matrix als kleinere. Dadurch wird eine Auftrennung der DNA-/RNA-Fragmente nach Größe möglich. Durch paralleles Auftragen standardisierter Fragmente von bekannter Länge (DNA- bzw. RNA-Längenstandards) und Vergleich der Wanderungstrecken kann die Größe von PCR-Produkten ermittelt werden.

- Ethidiumbromid

Zur Veranschaulichung der DNA/RNA im Agarosegel gibt man dem geschmolzenen Agarosegel etwas Ethidiumbromid zu (0,1-0,5µg/ml). Durch Interkalieren der Ethidiumbromid-Moleküle in die DNA/RNA kann der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex noch im Verlauf bzw. sofort nach Beendigung der Auftrennung im UV-Licht als rot-orange leuchtende Bande sichtbar gemacht werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 5-10ng DNA, bei Einzelstrang-Nukleotiden (RNA-Proben) ist die Affinität des Ethidiumbromids jedoch geringer, infolgedessen sinkt die Nachweisgrenze drastisch.

- Elektrophoresepufferzusammensetzung, pH, Ionenstärke, Temperatur

Niedrige Ionenkonzentrationen bedingen eine geringe Leitfähigkeit, die DNA/RNA wandert nur langsam. Hohe Ionenkonzentrationen verursachen neben schneller Wanderungsgeschwindigkeit auch eine starke Hitzeentwicklung, das Gel kann schmelzen.

Als Laufpuffer für DNA-Elektrophoresen wird TAE (Tris-Acetat+EDTA, pH8) verwendet, welcher 10% höhere Wanderungsgeschwindigkeiten als andere Puffer liefert.

Laufpuffer für RNA-Elektrophoresen bestehen aus einem Gemisch aus 3-Morpholino-1-Propansulfonsäure (MOPS) und Natriumacetat, da Tris durch das in den RNA-Agarosegelen enthaltene Formaldehyd beeinträchtigt würde. Die Gele enthalten stets 1,1% Formaldehyd, welches durch Bildung Schiffscher Basen zwischen seiner Aldehydgruppe und den Aminogruppen der Nukleinsäurebasen eine denaturierende Wirkung auf die RNA ausübt. Sekundärstruktur- und Aggregatbildung sind so nicht mehr möglich.

Der Ladepuffer erhöht die Dichte der DNA-/RNA-Lösung und führt zu einer Anfärbung derselben - beides erleichtert das Einfüllen in die Geltaschen. Die Farbstoffe wandern im Gel mit und zeigen den Fortschritt der Elektrophorese an. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Bromphenolblau entspricht in etwa einem 300 bp langem Fragment, die von Xylenzanol einem 4000 bp langem Fragment. Das im RNA-Laufpuffer enthaltene Formamid zerstört außerdem die Basenpaarungen der RNA und ermöglicht so eine Reaktion der Basen mit Formaldehyd.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wird die DNA/RNA mit Hilfe des gebundenen Ethidiumbromids auf Transluminatoren sichtbar gemacht; letzteres absorbiert UV-Licht der Wellenlänge 312nm und fluoresziert im sichtbaren Bereich bei 590nm rot-orange.

### **Versuchsdurchführung:**

Zunächst wurde das entsprechende 1%ige Agarosegel (Porengröße 150nm, Trennbereich für lineare DNA-Fragmente 0,5-7kb) mit Ethidiumbromidzusatz (0,4µg/ml) gegossen. Nach dem Aushärten wurde dieses unter Beachtung der DNA-/RNA-Wanderungsrichtung zur Anode hin in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Pufferreservoirs der Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Durch Kämme erzeugte man vor dem Einsetzen Geltaschen von 0,5cm Breite und 0,1cm Tiefe in welche nun die zu untersuchenden und mit 1/5-1/10 Ladepuffer versetzten DNA-/RNA-Proben per Pipette eingefüllt wurden. Der Deckel wurde geschlossen und eine Spannung von 5(-20)V pro cm Elektrodenabstand angelegt.

Spannung: 75-300V für 30-60min, das Ethidiumbromid wanderte von + nach -.

Banden: Bromphenolblau-Bande bei 300 bp, Xylencyanol-Bande bei 4 kbp

RNA-Gel:

Mini-Gel (50ml Ansatz):

0,5g Agarose 1% wurden in 43,5ml Bidest gelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht und danach abgekühlt (60°C). Nun fügte man 5ml 10x MOPS, 1,5ml 37%iges Formalin und 5µl Ethidiumbromid zu und goß das Gel.

Probe (15-20µl):

5-10µl RNA in 15µl RNA-Ladepuffer.

Ladepuffer:

0,05g Bromphenolblau, 0,05g Xylencyanol, 2ml Glycerol, 10ml Formamid, 2ml 10x MOPS, 3,4ml 37%iges Formalin und 1,6ml DEPC-Wasser wurden vermisch und anschließend filtriert.

Laufpuffer: 1x MOPS

10x MOPS (41,8g MOPS+ 16,6ml 3M NaOAc+ 20ml 0,5M EDTA, pH7,0, DEPC-H<sub>2</sub>O ad 1l)

DNA-Gel:

Mini-Gel (50ml Ansatz):

0,5g Agarose 1% wurden in 50ml 1x TAE gelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht und auf 60°C abgekühlt. Danach gab man 5µl Ethidiumbromid dazu und goß das Gel.

Probe (15-20µl):

5-10µl DNA in 15µl DNA-Ladepuffer.

Ladepuffer:

0,05g Bromphenolblau, 0,05g Xylencyanol, 3g Ficoll400 und 3ml 0,5M EDTA wurden mit 1x TAE auf 20ml aufgefüllt und filtriert.

Laufpuffer: 1x TAE

10x TAE (48,4g TRIS+ 11,4ml Essigsäure+ 20ml 0,5M EDTA, pH8,4, Bidest ad 1l)

Die Dokumentation erfolgte mit einer Polaroidkamera (Film Typ 57 oder 667, Asa 3000).

## 4. ERGEBNISSE

Die Darstellung der Ergebnisse der Reversen Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) erfolgt in Kapitel 4.1, die der *in-situ* Hybridisierung (ISH) in Kapitel 4.2. Innerhalb der Kapitel wird zuerst die Situation bei normaler Spermatogenese bei den Spezies Mensch, *Macaca fascicularis* und Maus (RT-PCR, vgl.4.1.1) bzw. Mensch, *Macaca fascicularis*, Maus und Pferd (ISH, vgl.4.2.1) dargestellt, danach folgen die Ergebnisse bei Spermatogenese-arrest von Mensch und CREM knock-out Maus (vgl.4.1.2 und 4.2.2). Bei Affe und Pferd lag kein Untersuchungsmaterial mit gestörter Spermatogenese vor. Die zugehörigen Abbildungen und Grafiken sind zur besseren Übersicht am Ende der entsprechenden Kapitel zusammengestellt. Kapitel 4.3 gibt eine vergleichende Zusammenfassung zwischen den Ergebnissen der RT-PCR und der ISH, wiederum zunächst bei normaler (vgl.4.3.1), dann bei gestörter Spermatogenese (vgl.4.3.2).

Kap.4.1 RT-PCR		Kap.4.2 ISH	
Normale Spermatog.	Spermatog.arrest	Normale Spermatog.	Spermatog.arrest
(Mensch, Affe, Maus)	(Mensch, CREM-Ko-Maus)	(Mensch, Affe, Maus, Pferd)	(Mensch, CREM-Ko-Maus)
Kap.4.3 Vergleich der ACT-Expressionsmuster			
Normale Spermatog.		Spermatog.arrest	

## 4.1 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Generelle Anmerkungen zur PCR:

Die DNA-Sequenz für ACT ist für die Spezies Mensch, *Macaca fascicularis* und Maus bekannt, nicht aber für das Pferd. Mit den humanspezifischen Primern für ACT konnte beim Pferd kein Amplifikationsprodukt erzeugt werden. Die Ermittlung der ACT-Sequenz für das Pferd wurde jedoch nicht in Betracht gezogen, da sie keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn zur Kernaussage geliefert und zudem den Rahmen dieser Untersuchung gesprengt hätte.

Die Angaben „schwaches“ oder „starkes“ Signal beruhen auf subjektiven Einschätzungen der Helligkeitsintensität der Banden für ACT im Vergleich zu den entsprechenden Banden für  $\beta$ -Actin. Da Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert, besteht eine direkte Korrelation zwischen nachgewiesener Nukleinsäuremenge und Intensität der Banden.

Kontrollen:

Als Negativkontrolle wurde der Versuchsansatz ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase (vgl. Versuchsdurchführung 3.2.2) durchgeführt, so kann die mRNA nicht in cDNA umgeschrieben werden.

Als interner Standard (Positivkontrolle) wurde  $\beta$ -Actin gewählt, welches deutliche Banden bei 202 bp erzeugt (Primer vgl. 3.2.3).

Die Spezifität der ACT-Sonde wurde durch die Sequenzierung des 346 bp PCR-Produktes durch Qiagen gewährleistet.

#### **4.1.1 Normale Spermatogenese**

Die RT-PCR mit dem Primerpaar gegen ACT ergab bei Mensch, Affe und Maus je eine deutliche Bande bei 346 bp (Abb.17 Lane 1, 6 und 8, obere Reihe). Sequenzierung (Quiagen) der aus dem Agarosegel ausgeschnittenen Banden identifizierte die Amplifikate eindeutig als ACT.

Die RT-PCR für  $\beta$ -Actin resultierte in allen drei der oben angeführten Fälle in einer deutlichen Bande bei 202 bp (Abb.17 Lane 1, 6 und 8, untere Reihe).

Negativkontrollen ohne Reverse Transkriptase erzeugten keine Amplifikationsprodukte, weder für ACT noch für  $\beta$ -Actin (Abb.17 Lane 7).

#### **4.1.2 Spermatogenese-arrest**

Bei unfruchtbaren Männern, welche histologisch einen Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden aufweisen, war das ACT-Expressionsmuster heterogen. Während ein Patient (Patient 1) ein deutliches Amplifikationsprodukt erzeugte (Abb.17 Lane 2), zeigten die Patienten 2, 3 und 4 nur ein schwaches Signal (Abb.17 Lane 3, 4 und 5). Wie in Abb.17 ersichtlich, weist Patient 4 auch für  $\beta$ -Actin nur ein schwaches Signal auf, so daß die schwach ausgeprägte Bande für ACT auf z.B. suboptimale Gewebefixierung bzw. RNA Degradierung zurückzuführen ist. Es ist daher davon auszugehen, daß sich bei diesem Patienten die Bande für ACT schwächer darstellt als es bei optimalen Bedingungen zu erwarten wäre.

Die beiden Mäuse ohne funktionelles CREM-Gen, die histologisch ebenfalls einen Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden aufweisen, bildeten nur ein sehr schwaches Signal für ACT aus, zeigten aber deutliche Amplifikationsprodukte für  $\beta$ -Actin (Abb.17 Lane 9 und 10).

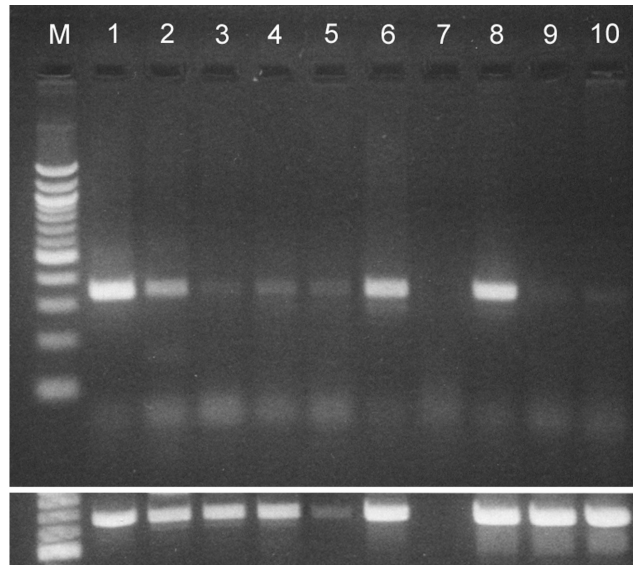


Abb.17 RT-PCR an Hodenhomogenaten von Mensch, Java-Affe und Maus. Die obere Reihe zeigt die Ergebnisse für das 346 bp ACT-Produkt, die untere Reihe für das 202 bp  $\beta$ -Actin-Produkt. M: 100 bp DNA-Marker.

Mensch : Lane 1-5	1	normale Spermatogenese,
	2-5	Patienten mit Spermatidenarrest (Patienten 1-4)
Affe : Lane 6+7	6	normale Spermatogenese,
	7	Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase
Maus : Lane 8-10	8	normale Spermatogenese,
	9, 10	CREM knock-out Maus mit Spermatidenarrest

## 4.2 *In-situ* Hybridisierung (ISH)

Generelle Anmerkungen zur ISH:

Die ISH wurde in der vorliegenden Studie zum Nachweis von mRNA in Paraffinschnitten eingesetzt. Sie ist eine rein qualitative Methode. Die Menge der in einer Zelle vorhandenen mRNA korreliert jedoch mit der Entwicklungszeit und der Intensität der Farbreaktion durch NBT/BCIP, d.h. wenig mRNA bedeutet längere Entwicklungszeit oder aber Entwicklung eines schwächeren Farbsignals. Da die Reaktionszeit bei den verschiedenen Spezies zunächst identisch gehalten wurde, ist ein Vergleich zwischen den Spezies durch die Intensität des Farbsignals möglich. Der Mensch beispielsweise zeigte in allen Präparaten eine nur schwache Farbreaktion, während das Pferd sehr deutliche und klare Farbsignale ausbildete. Die Angaben „schwaches“ Signal (hellbraune Farbreaktion) oder „starkes“ Signal (dunkelbraune bis blauschwarze Farbreaktion) beruhen auf subjektiven Einschätzungen.

Die Präparate verschiedener Spezies wurden parallel und somit unter gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Nach Optimierung des Protokolls kamen pro untersuchter Spezies bzw. pro Patient mindestens 4 histologische Schnitte zur Anwendung.

Die Spezifität der RNA-Sonden wurde durch Sequenzierung (Qiagen) sichergestellt. Wie bereits in Kapitel 4.1 ausgeführt, ist die DNA-Sequenz für das Pferd nicht bekannt. Mit der humanspezifischen Sonde konnte beim Pferd jedoch eine spezifische und deutliche Farbreaktion erzielt werden.

Kontrollen:

Als Negativkontrolle diente die mittels *in-vitro* Transkription parallel zur Antisense-Sonde *Not1* hergestellte Sense-Sonde *Nco1* (vgl. 3.2.4), die nicht mit der entsprechenden ACT-mRNA hybridisieren kann und somit keine Farbsignale ausbildet.



### 4.2.1 Normale Spermatogenese

#### Mensch

Die ACT-cRNA Antisense-Sonde erzeugte starke Signale in primären pachytänen Spermatozyten (Stadium I-VI) und schwache Signale in runden step1 und step2 Spermatiden (Stadium I+II) (Abb.18 A).

#### Affe

Die ACT-mRNA konnte durch die Antisense-Sonde in primären pachytänen Spermatozyten (Stadium V-XII) und in runden step 1-7 Spermatiden (Stadium I-VII) nachgewiesen werden (Abb.18 E).

#### Maus

Die ACT-cRNA Antisense-Sonde zeigte starke Signale in primären pachytänen Spermatozyten (Stadium V-XII) und in runden step 1-8 Spermatiden (Stadium I-VIII) (Abb.18 G).

In den Stadien I-IV wiesen nur die runden Spermatiden positive Signale auf, während in den Stadien V-VIII primäre pachytäne Spermatozyten und runde Spermatiden und in den Stadien IX-XII nur die primären pachytänen Spermatozyten eine positive Farbreaktion für die ACT-mRNA zeigten (Abb.19).

#### Pferd

Die ACT-mRNA erzeugte eine kräftige Farbreaktion in primären pachytänen Spermatozyten (Stadium I-VIII) und eine schwächere in runden step 1-3 Spermatiden (Stadium V-VII) (Abb.18 J).

Die bei allen Spezies mit der ACT-cRNA Sense-Sonde durchgeführten Negativkontrollen zeigten keine Signale (Abb.18 B, F, H, K).

Eine Zusammenfassung des zell- und stadienspezifischen ACT-Expressionsmusters aller vier Spezies während der normalen Spermatogenese ist in Abb.20 dargestellt.

#### **4.2.2 Spermatogenese-arrest**

##### **Mensch**

Bei Patienten, welche einen Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatozyten aufweisen, war nur eine auffällig geringe Zahl runder Spermatozyten im Keimzellepithel nachweisbar, die sich zudem oft in einem multinukleären Zustand befanden. Insgesamt war die ACT-mRNA Expression drastisch vermindert oder sogar komplett aufgehoben. Nur ein Patient (Abb.18 C, Patient 1) wies sehr schwache Signale in einigen pachytänen Spermatozyten und runden Spermatozyten auf, die drei anderen Patienten (Abb.18 D, Patient 4) erzeugten keine ACT-mRNA.

##### **CREM knock-out Maus**

Mäuse ohne funktionelles CREM-Gen zeigen histologisch das Bild eines Spermatozytenreifungsdefekts. Lediglich einige wenige der runden Spermatozyten aber keine der pachytänen Spermatozyten wiesen ein Farbsignal auf. Dieses war zudem im Vergleich zur Kontroll-ISH des Wildtyps nur sehr schwach ausgeprägt (Abb.18 I und G).

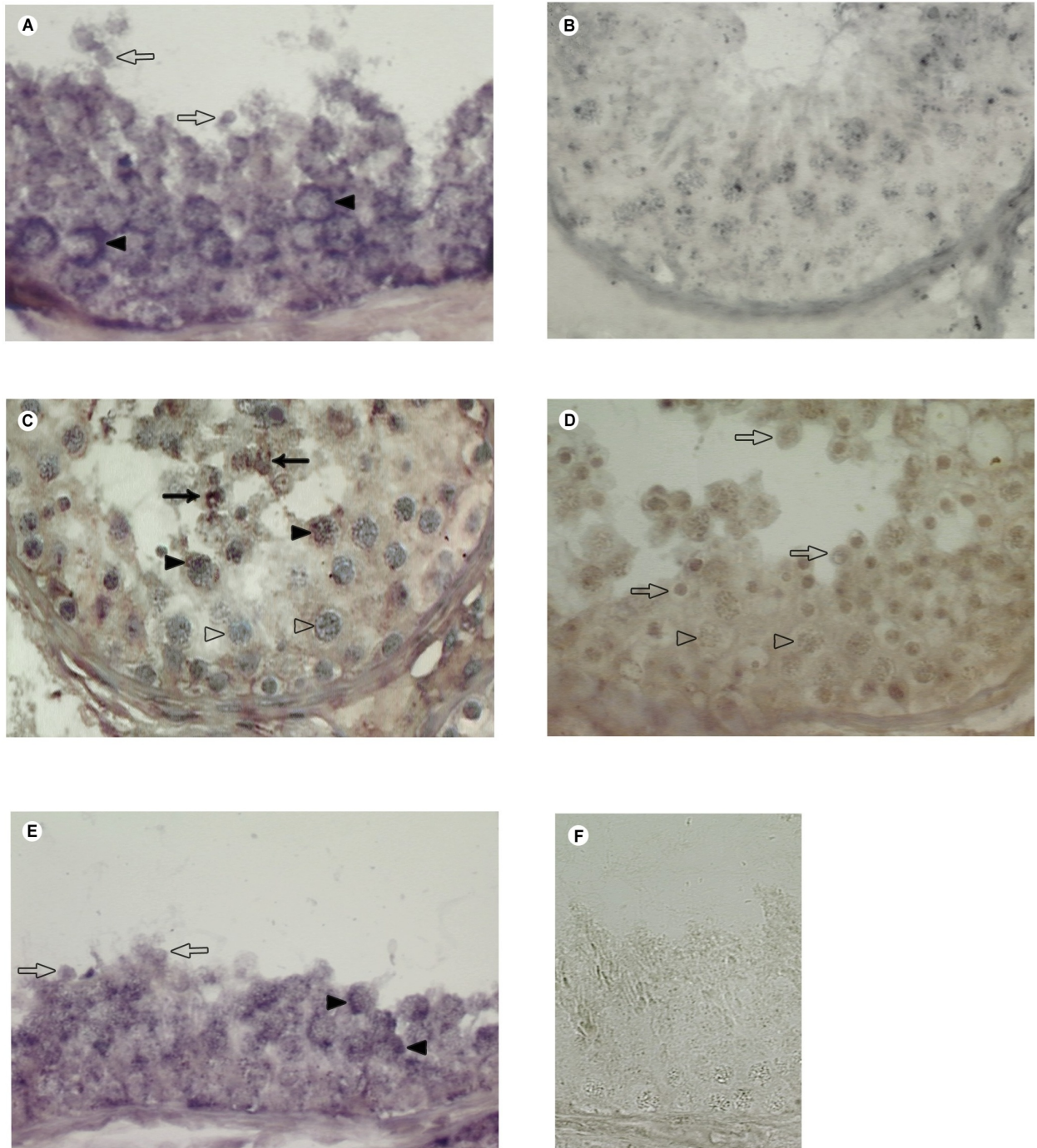


Abb.18 *In-situ* Hybridisierung zum Nachweis der Expression von ACT-mRNA bei normaler Spermatogenese bzw. bei Spermatogenese-arrest im Keimepithel von Mensch (A-D) und Affe (E, F), Legende siehe S.72.

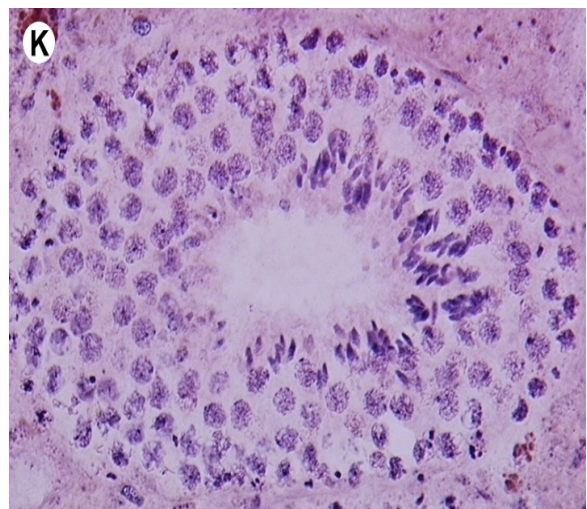
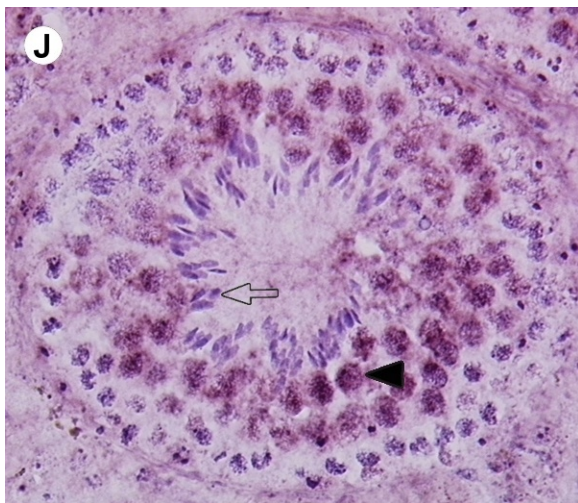
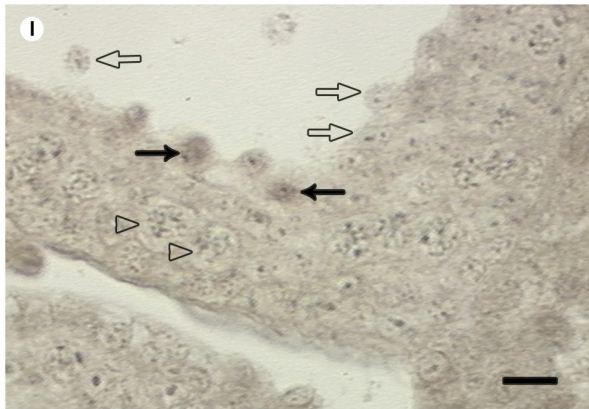
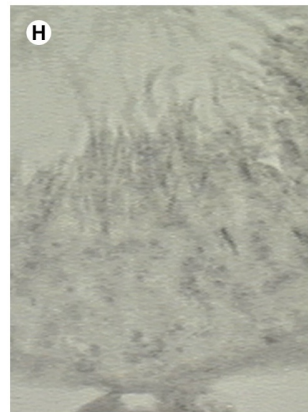
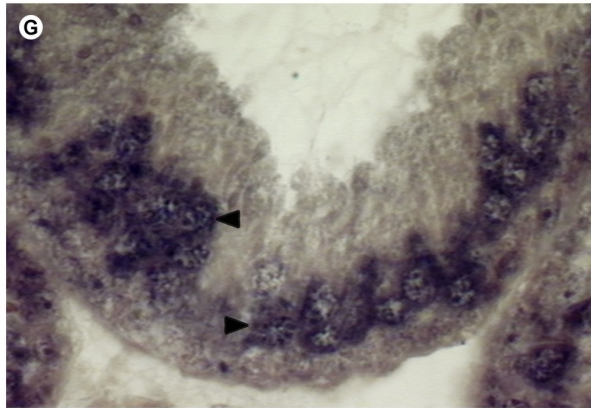


Abb.18 *In-situ* Hybridisierung zum Nachweis der Expression von ACT-mRNA bei normaler Spermatogenese bzw. bei Spermatogenese-arrest im Keimepithel von Maus (G-I) und Pferd (J, K), Legende siehe Folgeseite.

# Legende zu Abb.18

*In-situ* Hybridisierung zum Nachweis der Expression von ACT-mRNA bei normaler Spermatogenese bzw. bei Spermatogenese-arrest im Keimepithel von Mensch (A-D), Affe (E, F), Maus (G-I) und Pferd (J, K)

- A = Mensch, normale Spermatogenese
- B = Mensch, normale Spermatogenese, Negativkontrolle
- C = Mensch, Spermatidenarrest, Patient 1
- D = Mensch, Spermatidenarrest, Patient 4
- E = *Macaca fascicularis*, normale Spermatogenese
- F = *Macaca fascicularis*, normale Spermatogenese, Negativkontrolle
- G = Maus, normale Spermatogenese
- H = Maus, normale Spermatogenese, Negativkontrolle
- I = CREM knock-out Maus
- J = Pferd, normale Spermatogenese
- K = Pferd, normale Spermatogenese, Negativkontrolle

Schwarze Dreiecke: positive Spermatozyten im Pachytän

Weißer Dreiecke: negative Spermatozyten im Pachytän

Schwarze Pfeile: positive runde Spermatiden

Weißer Pfeile: negative runde Spermatiden

Maßstab: schwarzer Balken = 10µm



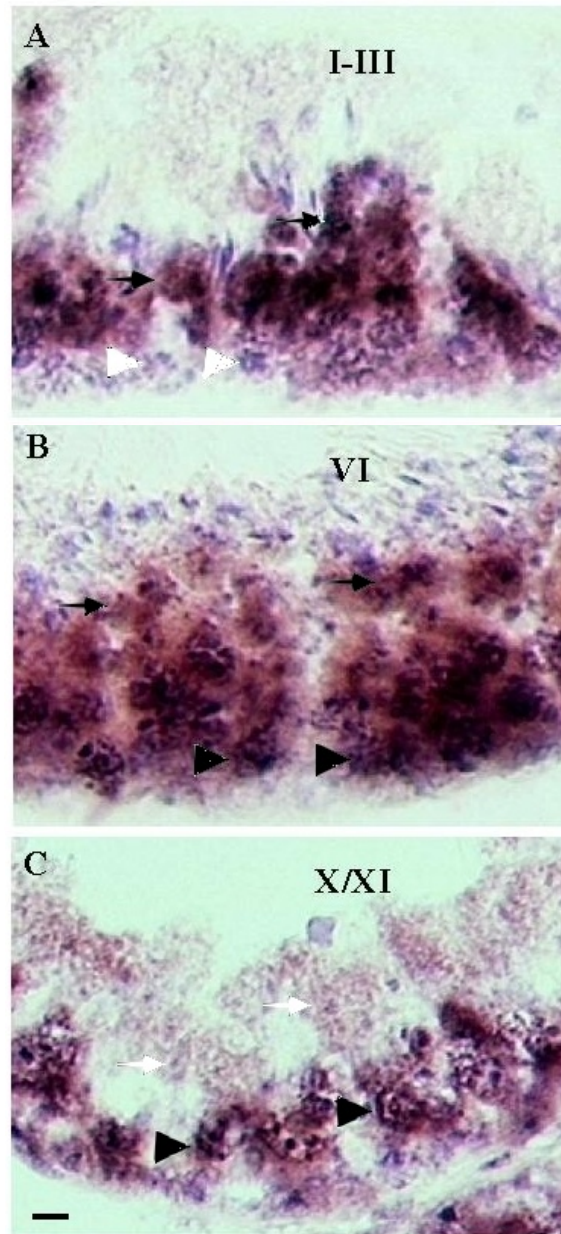


Abb.19 ISH zur Darstellung der ACT-mRNA Expression im Hoden der Maus. Die Abbildungen A-C zeigen die zelltypische ACT-Lokalisation in den Stadien I-III (A), VI (B) sowie X/XI (C) des Keimepithelzyklus.

Schwarze Dreiecke: positive Spermatozyten im Pachytän

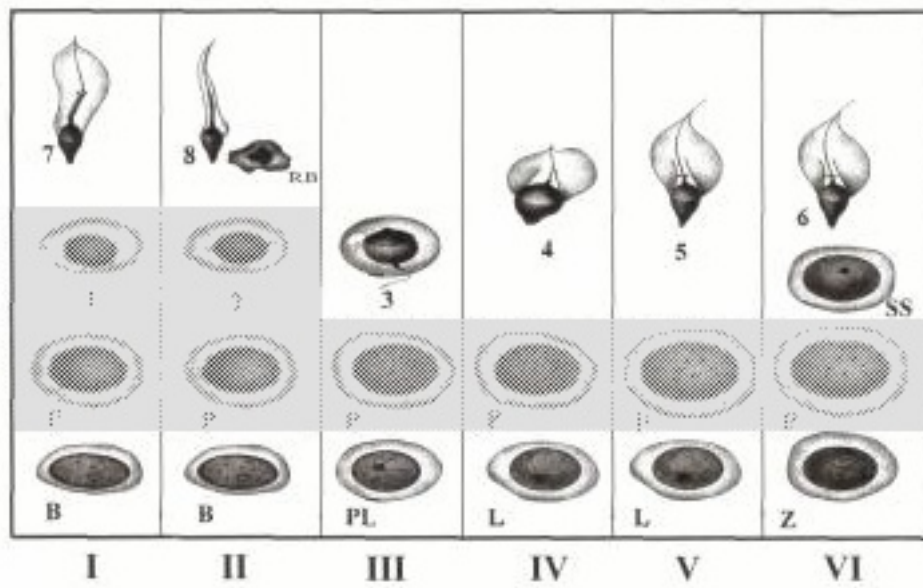
Weisse Dreiecke: negative Spermatozyten im Pachytän

Schwarze Pfeile: positive runde Spermatiden

Weisse Pfeile: negative runde Spermatiden

Maßstab: schwarzer Balken = 10µm

**A**



**B**

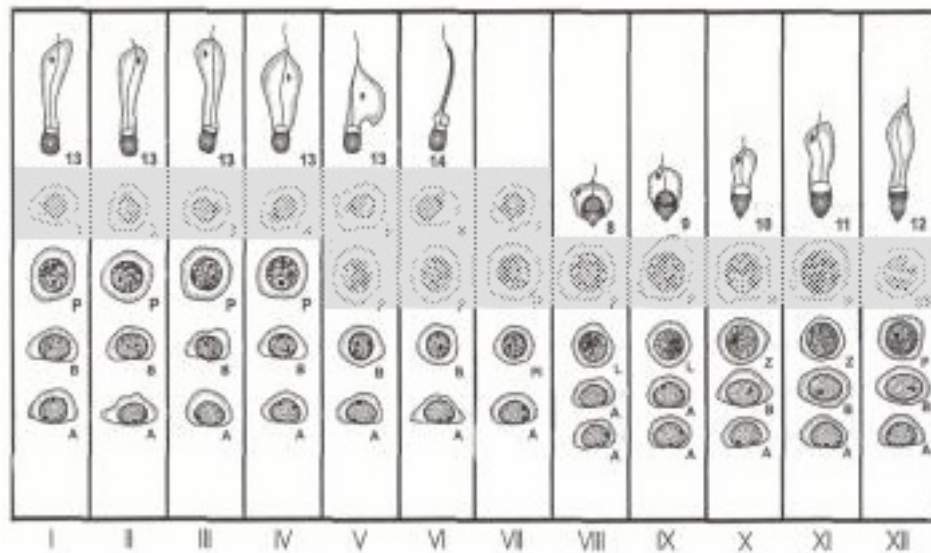
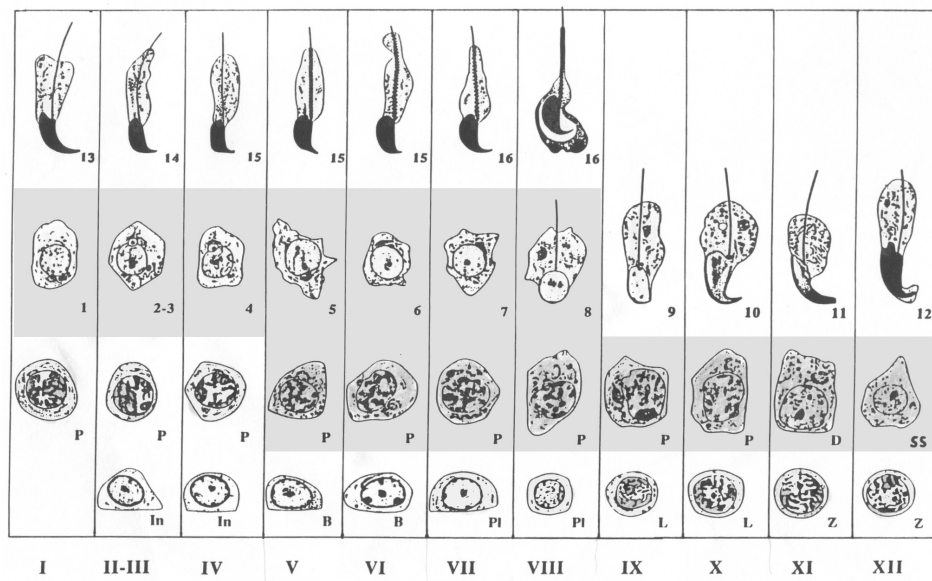


Abb.20 Schematische Darstellung des Keimepithelzyklusses von Mensch (20A, nach Clermont, 1963) und Affe (20B, nach Behr u. Weinbauer, 1999) unter Berücksichtigung der stadienspezifischen ACT-mRNA Expression bei normaler Spermatogenese (grau unterlegt), Legende siehe S.76.

C



D

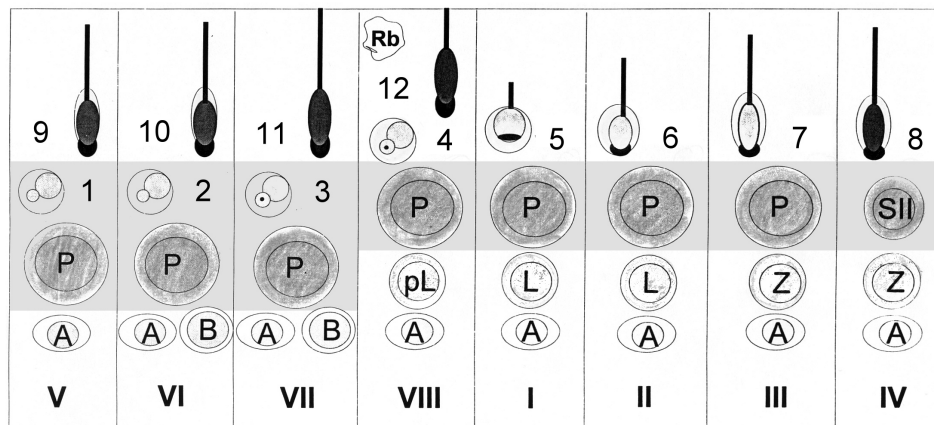


Abb.20 Schematische Darstellung des Keimepithelzyklusses von Maus (20C, nach *Russell et al.*, 1990) und Pferd (20D, nach *Johnsen et al.*, 1970) unter Berücksichtigung der stadienspezifischen ACT-mRNA Expression bei normaler Spermatogenese (grau unterlegt), Legende siehe Folgeseite.



### Legende zu Abb.20

Schematische Darstellung des Keimepithelzyklusses von Mensch (20A, nach *Clermont, 1963*), Affe (20B, nach *Behr u. Weinbauer, 1999*), Maus (20C, nach *Russell et al., 1990*) und Pferd (20D, nach *Johnsen et al., 1970*) unter Berücksichtigung der stadienspezifischen ACT-mRNA Expression bei normaler Spermatogenese (grau unterlegt).

Die römischen Ziffern repräsentieren das jeweilige Stadium des Keimepithelzyklus, die arabischen Zahlen die Spermiogeneseschritte (steps).

A = A-Spermatogonie

In = Intermediäre Spermatogonie

B = B-Spermatogonie

PL = Primäre Spermatozyten im Präleptotän, L = im Leptotän, Z = im Zygotän,  
P = im Pachytän

SS = Sekundäre Spermatozyten

1-16 = Spermatiden verschiedener Entwicklungsstufen

RB = Residualkörper

## **4.3 Vergleich der ACT-Expressionsmuster der untersuchten Spezies**

### **4.3.1 Normale Spermatogenese**

Bei der RT-PCR erhielt man bei allen Spezies kräftige und spezifische Banden, welche im Rahmen der nachfolgenden Sequenzierung (Qiagen) zweifelsfrei als ACT identifiziert wurden.

In der ISH fiel der ACT-Nachweis in den pachytänen Spermatozyten bei allen Spezies intensiver aus als in den runden Spermatiden, beim Menschen war die Reaktion bei allen Präparaten etwas schwächer ausgeprägt als bei Affe, Maus und Pferd.

### **4.3.2 Spermatogenese-arrest**

Mensch

RT-PCR und ISH resultierten bei den vier Patienten in einem heterogenen aber zueinander stimmigen Signalverteilungsmuster der ACT-Expression. Patient 1 zeigte eine deutliche Bande in der RT-PCR (Abb.17 Lane 2) und in der ISH eine zumindest schwache Färbung in pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden (Abb.18 C, Patient 1). Die Patienten 2-4 (Abb.17 Lane 3-5) erzeugten in der RT-PCR nur schwache Amplifikationsprodukte, wobei die Aussagekraft des Signals bei Patient 4 aufgrund der ebenfalls nur sehr schwach ausgeprägten Bande für  $\beta$ -Actin fraglich ist. In der ISH konnte bei keinem dieser drei Patienten eine Farbreaktion nachgewiesen werden (Abb.18 D, Patient 4).

CREM knock-out Maus

Es konnte bei beiden Tieren nur ein sehr schwaches PCR-Produkt erzeugt werden (Abb.17 Lane 9, 10). Parallel hierzu wurde in der ISH nur ein sehr schwach ausgeprägter Farbniederschlag nachgewiesen. Dieser war zudem ausschließlich in einigen runden Spermatiden, aber nicht in pachytänen Spermatozyten lokalisiert (Abb.18 I).

Tab.1 Nachweis der ACT-mRNA durch Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und *in-situ* Hybridisierung (ISH)

Nachweismethode	RT-PCR		ISH	
Signal	→ Banden des		→ blauer Farbniederschlag in	
Spezies	346 bp Amplifikationsproduktes		pachytänen Sc.	runden Sd.
Probandenzahl				
MENSCH				
Normale SG 14	++++		+++	++
SG-Arrest 4	Patient 1 +++		Patient 1 +	+
	Patienten 2-3 ++		Patienten 2-4 -	-
AFFE				
Normale SG 4	++++		+++	++
MAUS				
Normale SG 4	++++		+++	+++
SG-Arrest 2	+		-	+
PFERD				
Normale SG 2	nicht durchgeführt		+++	++

Signalausprägung nach subjektiver Schätzung

++++ sehr stark

+++ stark

++ schwach

+ sehr schwach

- kein Nachweis

Sc. Spermatozyten

Sd. Spermatiden

SG Spermatogenese

## 5. DISKUSSION

### 5.1 ACT- Expression und Lokalisation

#### 5.1.1 ACT bei normaler Spermatogenese

In der vorliegenden Studie wurde die Genexpression von ACT erstmals unter Verwendung von RT-PCR und *in-situ* Hybridisierung im Hoden von vier verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Java-Affe, Pferd) untersucht. Während zu Java-Affe und Pferd bislang keine Veröffentlichungen zur Expression von ACT vorliegen, existieren zu Mensch und Maus bereits einige Untersuchungen, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit mit anderen Methoden einerseits bestätigt, andererseits erweitert werden konnten. So konnte in dieser Studie mit Hilfe der ISH die ACT Expression zell- und stadienspezifisch den verschiedenen Keimzellpopulationen zugeordnet werden.

Aus den Untersuchungen von *Blendy et al. (1996)* und *Nantel et al. (1996)* mit CREM knock-out Mäusen, die aufgrund eines Spermatogenese-arrests auf der Stufe von runden Spermatiden steril sind, läßt sich ableiten, daß dem Transkriptionsfaktor CREM eine Schlüsselrolle bei der Regulation der männlichen Fertilität zukommt. Zudem ist durch die Studien von *Fimia et al. (1999)* bekannt, daß CREM in Keimzellen, im Gegensatz zu somatischen Zellen, phosphorylierungsunabhängig durch ACT aktiviert wird. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß ACT bei normaler Spermatogenese als Aktivator von CREM in zeitlich früheren Stadien des Keimepithelzyklus als CREM exprimiert wird.

Im Folgenden werden somit zunächst die Expressionsmuster von ACT und CREM bei normaler Spermatogenese von Mensch, *Macaca fascicularis*, Maus und Pferd diskutiert.

#### 5.1.1.1 ACT-Expression beim Menschen

Die ACT-mRNA konnte via ISH in pachytänen Spermatozyten der Stadien I-VI sowie in runden step 1+2 Spermatiden nachgewiesen werden. Auffällig war, daß beim Menschen aus unbekannten Gründen die Farbsignale in Spermatozyten und Spermatiden im Vergleich zu allen anderen untersuchten Spezies stets schwächer ausfielen und desweiteren die Markierung der runden Spermatiden insgesamt schwächer war als die der Spermatozyten.

Untersuchungen zur Expression von CREM zeigten die CREM-mRNA in pachytänen Spermatozyten (Stadium IV+V) und in runden step 1-3 Spermatiden (*Steger et al., 1999*), während CREM-Protein lediglich in runden step 1-3 Spermatiden vorhanden war (*Weinbauer et al., 1998, Steger et al., 1999*).

Man erkennt hierbei eine zeitlich verzögerte Expression von CREM gegenüber ACT. ACT-mRNA (Stadien I-VI) tritt deutlich vor der CREM-mRNA (Stadien IV+V) auf und ist zudem länger nachweisbar. CREM-Protein wiederum ist zeitversetzt zu CREM-mRNA nur in runden step 1-3 Spermatiden zu finden, zeitweise auch zusammen mit ACT-mRNA (runde step 1+2 Spermatiden) und CREM-mRNA (runde step 1-3 Spermatiden). Der Nachweis der ACT-mRNA umspannt somit im Vergleich zur CREM-mRNA einen größeren Zeitrahmen.

*Morgan und Whawell (2000)* konnten mittels Northern Blot Analyse ACT-mRNA weder im Hodengewebe gesunder Männer noch in den übrigen untersuchten Gewebetypen nachweisen. Interessanterweise zeigten sie aber über die gleiche Untersuchungsmethode eine hohe ACT-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien (Plattenepithelkarzinom, Melanom, Leukämie) auf. Sie nahmen daher an, daß ACT während anderer Perioden der Hodenentwicklung als in den untersuchten Präparaten ausgebildet oder aber im Hoden nur in sehr geringer, nicht zu detektierender Menge exprimiert wird. Letzteres konnte durch die vorliegende Studie eindeutig widerlegt werden, da sowohl die RT-PCR als auch die ISH einen deutlichen Nachweis der ACT-mRNA im Hoden erbrachten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden auch durch die Untersuchungen von *Palermo et al. (2001)* bestätigt, die via Western Blot unter Zuhilfenahme eines anti-Maus ACT-Antikörpers im normalen Hodengewebe des Menschen eine Bande, in der Größe dem ACT-Protein entsprechend, allerdings in niedrigerer Konzentration als bei der Maus, nachweisen konnten.

### 5.1.1.2 ACT-Expression bei der Maus

ACT-Transkripte wurden in starker Ausprägung sowohl in pachytänen Spermatozyten (Stadium V-XII) wie auch in runden step 1-8 Spermatiden demonstriert.

Sowohl CREM-mRNA als auch CREM-Protein sind in pachytänen Spermatozyten sowie in runden Spermatiden nachzuweisen (*Delmas et al., 1993, Behr und Weinbauer, 1999, 2001*).

Ein direkter Vergleich des stadienspezifischen Auftretens von ACT und CREM wie beim Menschen ist bei der Maus aufgrund mangelnder Studien zu CREM nicht möglich.

Untersuchungen von *Fimia et al. (1999)* bekräftigen die von uns postulierte zeitlich versetzte Expression von ACT und CREM, allerdings wurde das Auftreten letzterer nur auf Proteinebene verglichen. Sie fanden in separierten und gereinigten Spermatiden eine Kolokalisation von CREM-Aktivatoren und ACT-Protein, während in Spermatozyten nur CREM, nicht aber ACT-Protein nachweisbar war.

Im Rahmen der Hodenentwicklung zeigten ACT und CREM ebenfalls überlappende Expressionsmodi (*Fimia et al., 1999*). So nahm die Menge detektierbarer ACT-Transkripte bei der Maus in der dritten bis vierten Lebenswoche entsprechend dem Ende der Meiose-Phase drastisch zu. Durch ISH konnte in dieser Arbeit die Expression der ACT-mRNA während der Keimzelldifferenzierung in temporärer Koordination mit der CREM-Expression bei adulten Mäusen bestätigt werden.

Weitere Studien von *Fimia et al. (1999)* mit ACT-spezifischen Antikörpern und verschiedenen Geweben der Maus zeigten über RNase protection assay, Immunhistochemie und Western Blot, daß die ACT-Expression hodenspezifisch erfolgt. ACT-Protein konnte in runden Spermatiden nachgewiesen werden, wobei es in step 1-7 Spermatiden ein nukleäres Signal, in step 8-10 Spermatiden ein zytoplasmatisches Signal ausprägte (*Fimia et al., 1999, Macho et al., 2002*). Unsere Studien unterstreichen diese Ergebnisse, da die ACT-mRNA zeitlich vor der Expression von ACT-Protein zu erwarten ist. In pachytänen Spermatozyten findet man ausschließlich ACT-mRNA, in step 1-7 Spermatiden sowohl ACT-mRNA als auch ACT-Protein, ersteres im Zytoplasma, letzteres im Nukleus der Keimzellen. In step 8 Spermatiden sind mRNA wie auch Protein im Zellplasma vertreten.

#### **5.1.1.3 ACT-Expression bei *Macaca fascicularis***

In der vorliegenden Studie stellte sich die ACT-mRNA in pachytänen Spermatozyten der Stadien V-XII sehr kräftig, in runden step 1-7 Spermatiden etwas schwächer dar.

CREM-mRNA wurde durch *Behr und Weinbauer (1999, 2000)* von pachytänen Spermatozyten des Stadium VII bis zu runden Spermatiden des Stadiums IX (step 1-9) nachgewiesen und CREM-Protein in pachytänen Spermatozyten Stadium VIII-XI sowie in step 1-9 Spermatiden; es lag damit ein nahezu identisches Expressionsmuster von CREM-mRNA und -Protein vor.

Beim Java-Affen weisen ACT-mRNA und CREM-mRNA ein über große Strecken überlappendes zeitliches Expressionsmodus auf, wobei ACT wiederum etwas früher in pachytänen Spermatozyten zu finden ist als CREM, während letzteres entsprechend länger in runden Spermatiden auftritt.

#### **5.1.1.4 ACT-Expression beim Pferd**

ACT-mRNA wurde vergleichbar den anderen von uns untersuchten Spezies in pachytänen Spermatozyten der Stadien I-VIII und in runden step 1-3 Spermatiden (Stadium V-VII) exprimiert. Das Pferd zeigte im Vergleich zu allen anderen Spezies die deutlichste Signalausprägung in Spermatozyten und in Spermatiden.

Bezüglich des stadienspezifischen Auftretens von CREM-mRNA und CREM-Protein beim Pferd liegen bislang keine veröffentlichten Untersuchungsergebnisse vor. *Blöcher et al. (2003)* identifizierten jedoch mittels RT-PCR in Hodenextrakten von gesunden Hengsten verschiedene CREM-Isoformen. Interessanterweise zeigen Hengste mit normaler Spermatogenese im Vergleich zum Menschen unterschiedliche Expressionsmuster der CREM-Isoformen. Beim Hengst konnten 6 Aktivatoren und 3 Repressoren nachgewiesen werden, beim Menschen dagegen lediglich 3 Aktivatoren dafür aber 7 Repressoren.

### 5.1.2 ACT bei gestörter Spermatogenese

Am Beispiel von Männern mit Spermatidenreifungsdefekt sowie CREM knock-out Mäusen konnte mittels RT-PCR und ISH eine stark reduzierte bzw. fehlende ACT-Expression bei Vorliegen einer gestörten Spermatogenese nachgewiesen werden. Über die Expression von ACT bei Spermatogenesestörungen lagen bislang keine Untersuchungen vor.

Bei der transkriptionalen Kontrolle der Spermatogenese spielt CREM bekanntermaßen eine entscheidende Rolle (*de Cesare und Sassone-Corsi, 2000*). CREM knock-out Mäuse sind steril aufgrund eines Spermatogenese-arrests auf der Stufe von runden Spermatiden (*Blendy et al., 1996, Nantel et al., 1996*) und Männer mit Spermatidenreifungsdefekt weisen einen Mangel an CREM-mRNA und CREM-Protein (*Weinbauer et al., 1998, Steger et al., 1999*) sowie einen kompletten Verlust an CREM-Aktivatorformen bei Vorhandensein von CREM-Repressoren auf (*Peri et al., 1998, Peri und Serio, 2000, Blöcher et al., 2003*). Durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie kann man den Mangel an CREM-mRNA respektive CREM-Protein in einer gestörten bzw. fehlenden Aktivierung durch ACT begründet sehen: entsprechend der in 5.1.1 verdeutlichten Koexpression von ACT und CREM im Keimepithel, ist bei einer reduzierten bis fehlenden Expression von ACT auch eine entsprechende downregulation der CREM-Expression zu erwarten.

Im histologischen Bild der in dieser Arbeit untersuchten Hodenbiopate waren sowohl beim Mann mit Spermatidenreifungsdefekt als auch bei der CREM knock-out Maus nur eine geringe Anzahl multinukleärer runder Spermatiden sowie eine Zunahme apoptotischer Keimzellen zu erkennen, wie bereits durch *Blendy et al. (1996)*, *Nantel et al. (1996)*, *Weinbauer et al. (1998)* und *Steger et al. (1999)* beschrieben. Letztere konnten weiterhin nachweisen, daß es im Falle der „bunten Atrophie“ durchaus zu einem Auftreten von Tubuli mit normaler CREM-Aktivator- bzw. CREM-Proteinexpression in unmittelbarer Nachbarschaft zu Tubuli mit fehlender CREM-Expression kommen kann.

*Sassone-Corsi (2000)* und *Peri und Serio (2000)* postulierten, daß die Integrität des CREM-Systems für die komplette Maturation der Spermien zum einen und die Verhinderung des übermäßigen Zelltods zum anderen essentiell ist. Ein Fehlen des postmeiotischen Switches von CREM-Repressor- zu Aktivator-Isoformen wurde mit einem Arrest der Spermatogenese assoziiert. Es wäre jedoch auch möglich, daß die CREM-Expression erst infolge des Spermatidenreifungsdefektes zum Stillstand käme.



Eine Studie von *Lin et al. (1998)* basierend auf spezifischen polyklonalen Antikörpern widerspricht der These, daß ein fehlender CREM-Switch für den Spermatogenese-arrest verantwortlich ist. Der Aktivator CREM $\tau$  wurde hier nämlich sowohl bei normaler Spermatogenese als auch bei Spermatidenreifungsdefekt und Hypospermatogenese nachgewiesen und fehlte lediglich bei Patienten mit Sertoli cell only Syndrom. Es wurde aber gezeigt, daß die testikuläre Apoptoserate bei Spermatogenese-arrest signifikant erhöht war. Letztere zählt als Schlüsselmodulator der Spermatogenese durch Regulation des empfindlichen Gleichgewichtes zwischen Zelldifferenzierung und Zelldegeneration, möglicherweise über spezifische Apoptoseregulatorgene. CREM könnte hierbei für den Grad der Keimzellapoptose mitverantwortlich sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen die Vermutung nahe, daß einer gestörten bzw. fehlenden ACT-Expression durch den daraus resultierenden Mangel an CREM eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Infertilitätsproblematik zukommt. Allerdings zeigen die Untersuchungen, daß durchaus Modifikationen der ACT-Expression im Rahmen der Spermatogenesestörungen möglich sind, welche auch eine unterschiedliche Expression von CREM bedingen könnten. Desweiteren bleibt ungeklärt, was das ursächliche Prinzip reduzierter bzw. aufgehobener Genexpression von ACT darstellt.

#### **5.1.2.1 ACT-Expression beim Menschen mit Spermatogenesestörung**

Unfruchtbare Männer mit einem Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden zeigten bei beiden Nachweisverfahren eine heterogene Expression des ACT.

Im Rahmen der RT-PCR wies ein Patient (Patient 1) ein deutliches Amplifikationsprodukt auf, während zwei Patienten (Patienten 2-3) lediglich schwache Signale exprimierten. Patient 4 war nicht eindeutig auszuwerten; die Bandenintensität war ähnlich denen der Patienten 2 und 3, jedoch zeigte auch die Kontrolle durch  $\beta$ -Actin bei Patient 4 eine nur schwache Bande. Analog zu dem heterogenen Expressionsmuster in der RT-PCR konnten in der ISH nur bei einem Patienten (Patient 1) sehr schwache Signale im Zytoplasma einiger pachytäner Spermatozyten sowie runder Spermatiden nachgewiesen werden, die anderen drei Patienten (Patienten 2-4) zeigten keine Reaktion. Bei allen Männern war zwar eine normale Anzahl pachytäner Spermatozyten zu finden, aber lediglich eine geringe Anzahl runder Spermatiden, die zudem häufig multinukleär waren.

Zieht man nun den Vergleich zur Expression von CREM, so unterstreichen Studien von *Steger et al. (1999)*, welche bei Männern mit Spermatidenreifungsdefekt CREM überhaupt nicht oder nur in schwacher Ausprägung nachweisen konnten, diese Ergebnisse. *Behr und Weinbauer (2000)* gelangen bei Patienten mit gestörter Spermatogenese der Nachweis zusätzlicher, ungewöhnlicher oder inakkurat gespleißter CREM-Transkripte. Inakkurates Spleißen könnte Isoformen erzeugen, die im Falle von Repressoren zwar an CRE binden, sich aber nicht mehr von der DNA lösen können, oder im Falle von Aktivatoren gar nicht an die CRE-Box binden und somit nicht zur Aktivierung des entsprechenden Gens führen.

Den heterogenen Expressionsmodus könnte man dadurch erklären, daß ACT verzögert oder inkomplett exprimiert oder nach normaler Expression später in einer bestimmten Differenzierungsstufe reprimiert oder durch gewisse noch unbekannte Faktoren in seiner Wirkung gehemmt wird.

Häufigste Ursache männlicher Infertilität ist das OAT-Syndrom. Dieses entspricht im histologischen Schnittbild, wie bereits erwähnt, der „bunten Atrophie“ (siehe 2.3.1 sowie 5.1.2), das heißt, man findet in den Hodentubuli Lokalisationen mit zumindest qualitativ normaler Spermatogenese in direkter Nachbarschaft zu Orten mit geringer bis fehlender Spermatogeneseaktivität (z.B. SCO-Tubuli). Selbst bei infertilen Männern existieren Bereiche mit Restspermatogenese (*Sigg, 1979, Silber et al., 1995*). *Weinbauer et al. (1998)* und *Steger et al. (1999)* konnten entsprechend nachweisen, daß im Hodengewebe Tubuli mit normaler unmittelbar neben Tubuli mit fehlender CREM-Expression zu finden sind. Daher ist anzunehmen, daß eine ähnliche Heterogenität in der Genexpression direkt benachbarter Lokalisationen im Hoden auch bei ACT auftreten kann. Dies erklärt auch die Tatsache, daß bei der RT-PCR, wo ja ein größerer Gewebeblock verwendet wird, durchaus eine schwache Bande auftreten kann, obwohl im entsprechenden histologischen Schnitt keine Farbreaktion zu erkennen ist (Patienten 2-4).

### **5.1.2.2 ACT-Expression bei der CREM knock-out Maus**

Beide CREM knock-out Mäuse wiesen in der RT-PCR wie auch in der ISH nur äußerst schwache Signale für ACT auf.

In der PCR zeigten sich jeweils nur sehr schwache Banden, ähnlich denen der Patienten 2-3 mit Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden. Die ISH präsentierte bei beiden Mäusen im Gegensatz zu den Patienten 2-4 mit Spermatogenesestörung sehr schwache Anfärbungen in einigen runden Spermatiden aber im Unterschied zu Patient 1 kein Signal in pachytänen Spermatozyten.

Die schwache Signalausprägung läßt wiederum auf eine verspätete oder/und inkomplette Expression des ACT-Genes oder ähnliche Mechanismen mit nachfolgendem Stop der Spermatidendifferenzierung und daraus resultierender Infertilität schließen. Die Ursache der reduzierten bis fehlenden ACT-Expression bei der CREM knock-out Maus kann nur in dem fehlenden CREM-Gen begründet sein. CREM muß somit seinerseits in die Aktivierung von ACT involviert sein! Diese Hypothese wird zudem durch die in 5.3 beschriebene Tatsache untermauert, daß sich im Promotor des ACT-Genes der Maus eine CRE-Box befindet. Wie diese Einflußnahme von CREM auf die Regulation von ACT vonstatten geht, wo doch die CREM-Expression selbst von der Aktivierung durch ACT abhängig ist, bleibt noch ungeklärt.

## 5.2 Das ACT-Protein - Sequenz und Struktur

Bei den untersuchten Spezies Mensch (Accession BC021723), *Macaca fascicularis* und Maus (Accession NM\_021318) ist das ACT-Protein gemäß den Sequenzierungsergebnissen der Studie von *Steger et al. (2004)* jeweils aus 284 Aminosäuren aufgebaut, welche vier komplette Kopien des LIM-Motivs und eine aminoterminal halbe LIM-Domäne umfassen. Zwischen jeweils zwei kompletten LIM-Domänen befinden sich acht Aminosäuren (Abb.21). ACT gehört zur Familie der LIM-only Proteine, die durch das Vorhandensein von ein bis fünf LIM-Domänen und das Fehlen jeglicher weiterer struktureller Domänen charakterisiert werden, und im Speziellen zur Gruppe der FHL (Four-and-a-Half LIM-domain) LIM-Proteine, welche man durch die spezielle Sekundärstruktur ihrer LIM-Domänen definiert (*Morgan und Madgwick, 1996*). Die LIM-Domänen sind stets aus doppelten Zink-Finger-Strukturen und einer hohen Anzahl an Cystein- und Histidinresten aufgebaut, welche für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich sein sollen (*Schmeichel und Beckerle, 1994*). Die Gleichartigkeit im Aufbau des ACT-Proteins bei verschiedenen Spezies läßt einen hohen Grad an Konservierung vermuten.

Weiterhin wurden im Rahmen der vorliegenden Studie die Primärstrukturen, d.h. die Aminosäurenabfolge des ACT-Proteins von Mensch, Affe und Maus, miteinander verglichen. Zwischen Mensch und Affe tritt eine fast vollständige Konservierung der Aminosäuresequenz auf. Lediglich an zwei Stellen der Aminosäurekette (Position 28 und 150) sind die Tyrosin-Reste der menschlichen Sequenz durch strukturell sehr ähnliche Phenylalanin-Reste beim Affen ersetzt worden.

Bei Betrachtung der Primärstrukturen des ACT-Proteins von Mensch und Maus findet man eine Übereinstimmung der Sequenz von näherungsweise 86% (243 von 284 Aminosäuren sind identisch). Betrachtet man Position 28 und 150 bei der Maus, erkennt man jeweils einen Tyrosin-Rest wie auch beim Menschen, was auf einen ziemlich spät erfolgten Nukleotidaustausch im Rahmen der Evolution schließen läßt.

Analysiert man die Sequenz des Proteins im Hinblick auf die LIM-Domänen (Vgl. Abb.21, grau unterlegte Bereiche), so wird deutlich, daß die zweite LIM-Domäne (2) am besten konserviert ist. Hier findet bei Affe und Maus im Vergleich zum Menschen nur bei zwei Aminosäuren ein Austausch gegen jeweils sehr ähnliche Aminosäuren statt. Außerdem bleiben die Linkersequenzen, welche die sekundäre LIM-Domäne flankieren, konstant. Die anderen LIM-Domänen weisen bei den untersuchten Spezies einen signifikant niedrigeren Grad der Sequenzkonservierung auf.



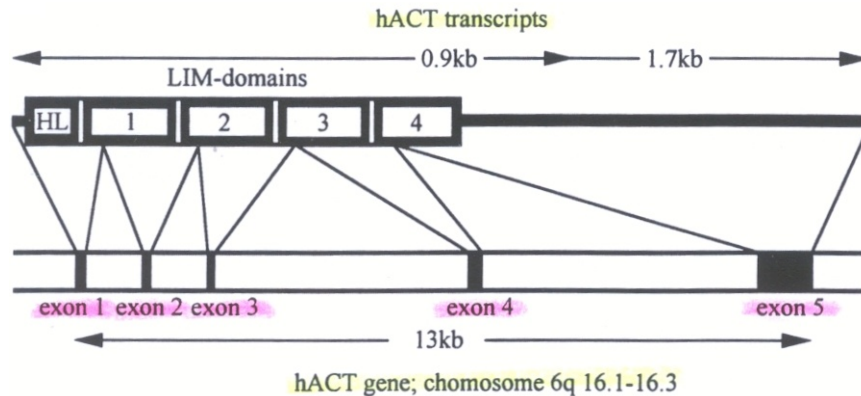


Abb.22 Schema des humanen ACT-Genes sowie des hACT-Transkriptionsproduktes nach *Morgan und Whawell (2000)*. Splicing der fünf Exons führt zu der charakteristischen Sekundärstruktur des ACT-Transkripts.

*Palermo et al. (2001)* bestätigten durch cDNA-Klonierung und Sequenzanalyse die Ergebnisse von *Morgan und Whawell (2000)* bezüglich der ACT-Sequenz des Menschen, entdeckten aber zusätzlich ein sechstes, nicht kodierendes Exon. Sie fanden eine Sequenzhomologie von 88% beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mensch und Maus.

Die Sequenzanalysen der Arbeit von *Steger et al. (2004)* bekräftigen somit bei Mensch und Maus die Studien von *Morgan und Whawell (2000)* sowie von *Palermo et al. (2001)*. Die ermittelte Sequenzhomologie von 86% bei Mensch und Maus liegt ebenfalls im Bereich der genannten Studien. Beim Java-Affen existieren bislang bezüglich Struktur und Sequenz von ACT keine Vergleichswerte.

Eine Studie zur Untersuchung der Transaktivierungskapazität verschieden mutierter ACT-Proteine der Maus (*Fimia et al., 2000*) zeigte, daß Deletion der N-terminalen halben, der ersten sowie der dritten LIM-Domäne die Aktivität des Proteins stark minderte. Mutationen der zweiten und vierten Domäne hingegen veränderten deren Potential zur Stimulation einer Transkription kaum. Keine der Deletionen führte jedoch zu einem kompletten Funktionsausfall des Proteins. Daher zogen *Fimia et al. (2000)* den Schluß, daß die volle Kapazität des ACT-Proteins ein Zusammenspiel aller LIM-Domänen erfordert. Die Analyse von Mutanten mit gleichzeitiger Deletion mehrerer LIM-Domänen ließ desweiteren die Hypothese zu, daß eine spezifische Kombination der verschiedenen LIM-Domänen für die volle transkriptionale Aktivität verantwortlich sei (siehe Abb.23).

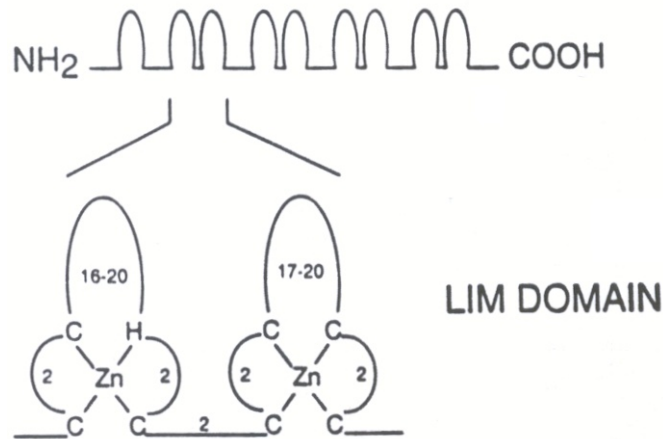


Abb.23 Doppelte Zink-Finger-Motive und korrespondierende LIM-Domänen als strukturbestimmende Elemente des ACT-Proteins (*Fimia et al., 1998*).

Der hohe Grad der Konservierung der zweiten LIM-Domäne unter den von *Steger et al. (2004)* untersuchten Spezies lässt vermuten, daß eher diese Domäne als wichtige Interaktionsfläche zwischen ACT und anderen Proteinen der Transkriptionsmaschinerie in Keimzellen anzusehen sei oder aber, daß durch ein funktionelles Zusammenspiel der zweiten und dritten Domäne temporär die eine oder die andere Domäne an Bedeutung überwiegt. Dies würde die von *Fimia et al. (1999, 2000)* anhand der Versuche mit Deletionsmutanten aufgestellte Hypothese unterstreichen, daß nicht eine Domäne allein, sondern vielmehr eine spezielle Kombination mehrerer LIM-Domänen die volle Funktionstüchtigkeit von ACT gewährleiste.

Da ACT ein keimzellspezifisches Protein darstellt, kann man spekulieren, daß die zweite LIM-Domäne von ACT mit anderen keimzellspezifischen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise TRF-2 interagiert (*Zhang et al., 2001*).

### 5.3 Interaktionen von ACT mit CREM

Um eventuelle Hinweise über die Steuerung der ACT-Expression und deren direkte oder indirekte Beeinflussung durch CREM zu erhalten, wurden in der Studie von *Steger et al. (2004)* die vermeintlichen Promotorregionen des ACT-Genes von Mensch und Maus analysiert. Zu diesem Zweck wählte man innerhalb der ACT-Transkripte von Mensch und Maus die längste 5'untranslierte Region (5'UTR) aus, von der anzunehmen war, sie könnte den Startpunkt der Transkription des ACT-Genes darstellen. Die resultierende Sequenz wurde mit dem entsprechenden Genomabschnitt verglichen und der Bereich 500 bp upstream des 5'Endes der mRNA auf eventuelle CRE's hin untersucht.

Dabei konnten zwei CRE's in der ACT-Promotorregion des Menschen an den Positionen -31 und -62 (relativ gesehen zu dem vermuteten Transkriptionsstartpunkt +1) identifiziert werden und eine im ACT-Promotor der Maus an Position -41. Siehe dazu Abb.24.

Die Tatsache, daß ACT bei CREM knock-out Mäusen und bei Männern mit Spermatidenreifungsdefekt nicht vorhanden oder zumindest drastisch reduziert und gleichzeitig CREM kaum oder überhaupt nicht nachweisbar ist (*Steger et al., 1999*), unterstützt die Annahme, daß CREM eine wichtige Funktion bei der transkriptionalen Regulation von ACT spielt. Der Nachweis gut konservierter CRE-Boxen bei der Analyse der vermeintlichen Promotorregionen von ACT bei Mensch und Maus stellt einen zusätzlichen Anhaltspunkt der direkten Einflußnahme von CREM auf die Transkription von ACT dar. Dennoch klärt es nicht, auf welche Art und Weise CREM den ACT-Promotor aktivieren kann, wo doch in Keimzellen die CREM-abhängige transkriptionale Aktivierung selbst von ACT als Transkriptionsfaktor abhängig ist. Die Ergebnisse von *Steger et al. (2004)* unterstützen somit die These, daß CREM eine Rolle im Rahmen der ACT-Expression spielen könnte, und betonen erneut die Bedeutung von CREM als Schlüsselprinzip bei der Regulation der Spermatogenese.



***Mensch:***

actttttgtg ttttgaagat ttcaaaagac tcaatgagtt tatgctttat **gaagtc**atag  
agccatggat **gtgatgtcac** aattgtggcc agctcaccag gaagcaggca **gagcggggaa**  
|→

***Maus:***

acacttcctg ttttgaagat ttcaaaagac cagatgagtt tgagcttcca **tgaagtcaca**  
cagtgtggct catgacataa caatcggtgt cagcacct**gg** **ggaccc** **aggcagaagtccaa**  
|→

Abb.24 CRE's im ACT-Promotor von Mensch und Maus.

Transkriptionsstartpunkt: fett gedruckt und Pfeil

CRE: fett gedruckt und unterstrichen

*Fimia et al. (1999)* identifizierten bei der Sequenzanalyse im Yeast-Two-Hybrid-Screen, daß die kodierende Sequenz der ACT-cDNA innerhalb des Hefe-Expressionsvektors nicht von der GAL4-Aktivierungsdomäne (vgl. 2.2.2.3.3) flankiert wurde, woraus sie folgerten, daß ACT in Hefezellen eine intrinsische Koaktivatorfähigkeit aufgrund einer autonomen Aktivierungsdomäne besäße. In den Hefezellen konnte ACT per se die CREM-abhängige Transkription aktivieren, wodurch der Nachweis erbracht wurde, daß ACT die Rekrutierung von CBP als essentielles Element der Aktivierung umgeht, da letzteres in Hefezellen nicht zur Verfügung steht. Eine Mutation von Serin in Alanin an Position 117, welche eine mögliche Phosphorylierungsreaktion an dieser Stelle verhinderte, beeinflusste die mittels Koimmunopräzipitation getestete CREM-ACT-Assoziation nicht, wodurch man eindeutig den Beweis einer Phosphorylierungsunabhängigkeit von ACT bei der Stimulation von CREM erbringen konnte. Der analoge Nachweis wurde auch für die Modulation von CREB durch Serin133-Mutation erbracht.

Bei Überprüfung des Bindungsverhaltens von ACT *in-vitro* anhand diverser CREM-Isoformen bzw. Deletionsmutanten (*Fimia et al., 1999*) erwies sich die P-Box allein als ausreichend für die ACT-Interaktion, während beispielsweise der interne Repressor ICER nicht als Zielsequenz des ACT dient. Dies deutet darauf hin, daß die DNA-Bindungsdomäne für die ACT-Bindung entbehrlich ist. Die ACT-medierte Koaktivierung fand jedoch

ausschließlich bei CREM-Aktivator-Isoformen statt. Nur bei ihnen stehen sowohl die P-Box wie auch zumindest eine glutaminreiche Domäne zur Verfügung. Es ist daher anzunehmen, daß *in-vivo* die P-Box in Kombination mit wenigstens einer Q-Domäne für die CREM-Aktivierung erforderlich ist.

Immunopräzipitation mit Anti-CREM-Antikörpern, durchgeführt nach Transfektion von CREM und ACT in Zellextrakte, und anschließende Western Blot Analyse zeigte, daß sich ACT mit CREM *in-vivo* in Form immunopräzipitierender Komplexe zusammenlagert. Die gleiche CREM-ACT-Assoziation konnte man nach Koimmunopräzipitation nativer Proteine eines Hodenextrakts aufzeigen (*Fimia et al., 1999*).

## **5.4 Vergleich von ACT mit anderen FHL-Proteinen**

Alle bislang beschriebenen LIM-Proteine scheinen an Zellproliferations- und Differenzierungsgeschehen beteiligt zu sein, insbesondere auch im Rahmen transkriptionaler Regulationsprozesse (ACT, FHL2) (*Sanchez-Garcia und Rabbits, 1994, de Cesare et al., 1999*). Sie sollen die Aktivität anderer Proteine modulieren oder auch als Brückenkomponenten fungieren (*Dawid et al., 1995*). Die Mitglieder der FHL-LIM-Protein-Familie, welche als charakteristische Strukturelemente vier komplette und eine halbe N-terminale LIM-Domänen besitzen, werden als eine neue Gruppe transkriptionaler Koaktivatoren angesehen.

Bislang wurden neben ACT vier weitere FHL-Proteine identifiziert:

FHL1 (=SLIM1), FHL2 (=DRAL/SLIM3), FHL3 (=SLIM2) und FHL4.

### **5.4.1 Struktur und Sequenz - FHL 1-4 und ACT**

Bei Betrachtung der Aminosäuresequenzen verschiedener FHL-Proteine der Maus wurde ein hohes Maß an Sequenzhomologie festgestellt (*Fimia et al., 2000*):

FHL2 zeigt mit 60% Identität und 80% Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz die höchste strukturelle Verwandtschaft zu ACT, gefolgt von FHL3 (68% Ähnlichkeit) und FHL1 und 4 (62% Ähnlichkeit). Die Reihenfolge der verschiedenen homologen LIM-Domänen bleibt stets

gleich und man erkennt innerhalb der LIM-Domänen spezielle hochkonservierte Aminosäuren. Dies unterstreicht die Hypothese, daß alle FHL-Proteine während der Evolution aus einer gemeinsamen Vorläuferform hervorgingen.

Beim Vergleich der LIM-Domänen verschiedener FHL-Proteine fiel auf, daß die dritte sowie die erste halbe LIM-Domäne des ACT einen signifikant niedrigeren Konservierungsgrad als bei FHL2 und 3 aufwiesen (*Fimia et al., 2000*). Dies könnte als Anzeichen einer spezialisierten Funktion dieser Domänen interpretiert werden.

Die Studie von *Steger et al. (2004)* zeigte jedoch, daß die zweite LIM-Domäne des ACT unter verschiedenen Säugetier-Spezies am besten konserviert war, woraus man schließen kann, daß diese eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit anderen Faktoren spielt. Ein Vergleich der übrigen FHL-Proteine bei verschiedenen Spezies unter besonderer Beachtung der zweiten LIM-Domäne könnte interessante Ergebnisse erbringen. Jedoch klärt dies nicht die Frage, inwieweit man aus einer Sequenzhomologie bzw. -konservierung tatsächlich auf gleiche Funktionalität schließen kann (vergleiche auch nachfolgende Ausführungen).

#### **5.4.2 Expressionsmuster**

Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, daß FHL-Gene eine gewebespezifische Expression aufweisen, allerdings mit unterschiedlicher Verteilung (*Genini et al., 1997, Lee et al., 1998, Fimia et al., 2000*). Im Mäusehoden wird neben ACT auch das LIM-Protein FHL4 ausgebildet (*Morgan und Madgwick, 1999*), beide sollen spezifisch in Keimzellen bzw. keimepithelassozierten Zellen anzutreffen sein (*Fimia et al., 2000*), wohingegen man die übrigen FHL-LIM-Proteine (FHL1-3) in erster Linie in quergestreifter Muskulatur und FHL1 auch in vielen anderen Geweben findet (*Morgan und Madgwick, 1996, Chan et al., 1998*). Bei dem Vergleich der Expression von ACT und FHL4 im Keimepithel scheint letzteres generalisierter, weniger stadienspezifisch und ohne Koordination mit CREM aufzutreten.

In der vorliegenden Studie konnte im Hodengewebe eine stadienspezifische Expression der ACT-mRNA nachgewiesen werden, welche in strenger Koordination zu CREM in primären pachytänen Spermatozyten sowie in runden Spermatiden erfolgt.

### 5.4.3 Transaktivierungskapazität

Auch bei den FHL-Proteinen 2-4 wurde ein intrinsisches Potential zur Stimulation einer Transkriptionsreaktion gefunden. Allerdings war dieses, außer im Falle von FHL3, deutlich geringer ausgeprägt als bei ACT (*Fimia et al, 2000*). FHL3 besaß sogar noch eine etwas höhere Aktivierungskapazität als ACT, obwohl sich die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen dieser beiden Proteine im Vergleich zu den anderen FHL-Proteinen nicht als besonders hoch erwies. FHL2 dagegen, welches den höchsten Grad an Sequenzhomologie mit ACT teilte, hatte ein sehr viel schwächeres Aktivierungspotential. *Fimia et al. (2000)* stellten daher die Hypothese auf, daß die Transaktivierungskapazität in erster Linie durch ein Zusammenspiel verschiedener Strukturdeterminanten im Allgemeinen und die relative Organisation der LIM-Domänen im Speziellen bestimmt sein könnte.

Diese Hypothese könnte wiederum die obigen Erkenntnisse erklären, wonach gemäß den Deletionsversuchen von *Fimia et al. (2000)* die dritte LIM-Domäne und nach den aus Sequenzanalysen von *Steger et al. (2004)* abgeleiteten Hinweisen eher die zweite Domäne als wichtiges Interaktionselement zwischen ACT und anderen Faktoren anzusehen sei. Dies unterstreicht die Schlußfolgerung, daß mehrere LIM-Domänen und eventuell eine temporär unterschiedliche Differenzierung ihrer Wirkung erst die volle Funktionstüchtigkeit des ACT-Proteins garantieren.

### 5.4.4 Interaktion mit CREM und CREB

Interessanterweise konnte trotz der starken Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen außer ACT keines der FHL-Proteine eine effiziente Assoziation mit CREM eingehen, stattdessen interagierten sie stark mit CREB. ACT kann sowohl CREM wie auch CREB binden, zeigt aber eine deutlich stärkere Affinität zu CREM, was auch in der Koexpression von ACT und CREM in Keimzellen zum Ausdruck kommt. FHL2 und 3 dagegen interagieren spezifisch mit CREB und sind vor allem in Herz- und Skelettmuskulatur lokalisiert, wo auch CREB eine deutlich höhere Expression als CREM aufweist (*Fimia et al., 2000*).

Die nach erfolgter Bindung herbeigeführte Modulation der transkriptionellen Aktivität von CREB war nach *Fimia et al. (2000)* bei ACT und FHL3 stark und bei FHL2 etwas schwächer ausgeprägt. Keines dieser Proteine benötigte hierfür eine Phosphorylierung des Serin133 und

die Assoziation mit CBP. Es ist anzunehmen, daß auch FHL2 und 3 als Koaktivatoren der CRE-medierten Transkription in Säugerzellen fungieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die von *Sassone-Corsi et al. (1999)*, *de Cesare et al. (1999)* und *Fimia et al. (1999, 2000)* aufgestellte Hypothese, daß ACT (und auch FHL2 und 3) Exempel einer neuen Klasse von CREM- bzw. CREB-Aktivatoren darstellen, die aufgrund ihrer intrinsischen Transaktivierungskapazität gewebespezifisch in bestimmten Schritten von Zell-Differenzierungsprogrammen zum Einsatz kommen.

Aber ACT wird noch durch weitere Faktoren beeinflusst, wie Beobachtungen von *Deng und Ling (2002)* im Zusammenhang mit dem sogenannten MIWI-Gen (murine piwi gene), einem Homolog der PIWI-Familie, welche in Stammzellerneuerung und translationale Kontrollmechanismen involviert ist, beweisen. MIWI wird in Spermatozyten und Spermatiden exprimiert und bildet mit den mRNAs von ACT und CREM-Zielgenen Komplexe. In MIWI-Null Mäusen kommt es zu Spermatogenese-arrest auf der Stufe von runden Spermatiden (ähnlich bei CREM-Null Mäusen). Außerdem sind bei diesen die mRNAs von ACT und CREM-Zielgenen down-reguliert. MIWI zeigt dagegen keinen direkten Einfluß auf die CREM-Expression. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man annehmen, daß MIWI durch die Stabilisation der mRNAs von ACT und CREM-Zielgenen und somit einer möglichen Modulation der ACT-Aktivität eine Rolle bei der Regulation der Spermatogenese spielt.

Eine Studie von *Macho et al. (2002)* zeigte, daß ACT eine spezifische Reaktion mit KIF17b eingeht, einem Kinesin, welches in männlichen Keimzellen in großer Anzahl exprimiert wird. Die ACT-KIF17b-Interaktion erfolgt nur in bestimmten Stadien der Spermatogenese und bestimmt direkt die intrazelluläre Lokalisation von ACT. KIF17b kann dabei durch den Crm1-Rezeptor aktiv aus dem Zellkern transportiert werden. Das Kinesin soll durch die Regulation der intrazellulären Lokalisation von ACT direkt die Aktivität dieses transkriptionalen Koaktivators kontrollieren.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Bildung befruchtungsfähiger Spermien ist eine strenge zeitliche und stadienspezifische Koordination der Genexpression während der Spermatogenese Voraussetzung. Bei der Regulation der Genexpression in haploiden Spermatiden spielt der Transkriptionsfaktor cAMP-responsive element modulator (CREM) eine entscheidende Rolle, da er über eine Bindung an die CRE-Box, die in der Promotorregion seiner Zielgene lokalisiert ist, zu einer Aktivierung für die Spermatogenese wichtiger Proteine, wie beispielsweise der Protamine, führt. Die Steuerung der transkriptionalen Aktivität von CREM erfolgt in Keimzellen – im Gegensatz zu somatischen Zellen – phosphorylierungsunabhängig durch den hodenspezifischen activator of CREM in testis (ACT). ACT tritt bei normaler Spermatogenese als nukleäres Protein stadienspezifisch in runden und elongierten Spermatiden auf und wird im Keimepithel mit CREM koexprimiert.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, erstmals die Genexpression und die Lokalisation der Transkripte von ACT bei normaler Spermatogenese sowie bei Spermatidenreifungsdefekt exemplarisch bei Mensch, Affe (*Macaca fascicularis*), Maus und Pferd darzustellen und in diesem Zusammenhang eine mögliche Assoziation einer abnormen Expression von ACT mit männlicher Infertilität nachzuweisen.

Mittels RT-PCR und *in-situ* Hybridisierung (ISH) gelang es, die ACT-mRNA im Hodengewebe zell- und stadienspezifisch darzustellen. Bei normaler Spermatogenese konnte mit Hilfe der RT-PCR bei Mensch, Affe und Maus ein Amplifikat gewonnen werden, welches durch Sequenzierung eindeutig als ACT identifiziert wurde. Durch die ISH konnte bei Mensch, Affe, Maus und Pferd die ACT-mRNA in Spermatozyten des mittleren und späten Pachytäns sowie in runden Spermatiden nachgewiesen werden. Von den infertilen Männern mit Spermatidenreifungsdefekt zeigte nur ein Patient ein starkes Signal für ACT, wohingegen die restlichen Patienten sowohl bei RT-PCR als auch bei ISH lediglich ein schwaches Signal ausbildeten. Interessanterweise exprimierten auch CREM knock-out Mäuse, von denen bekannt ist, daß sie aufgrund eines Spermatogenese-arrests auf der Stufe von runden Spermatiden unfruchtbar sind, nur ein schwaches Amplifikationsprodukt für ACT. ACT-mRNA war in einigen runden Spermatiden in schwacher Ausprägung nachweisbar, fehlte aber in pachytänen Spermatozyten.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen eine Rolle von CREM bei der ACT-Aktivierung vermuten. Das Fehlen bzw. die verminderte Expression von ACT bei Spermatidenarrest deuten auf eine wichtige Rolle bei der Differenzierung runder Spermatiden in befruchtungsfähige Spermien hin.

## 7. SUMMARY

For the production of fertile spermatozoa, the stringent temporal and stage-specific coordination of gene expression during spermatogenesis represents a prerequisite. A key role in the regulation of gene expression in haploid spermatids plays the transcription factor cAMP-responsive element modulator (CREM), which activates postmeiotic genes with high importance for spermatid differentiation, such as protamines, through binding to the CRE-box localized in the promoter region of its target genes. Contrary to somatic cells, in germ cells, the control of the transcriptional activity of CREM takes place in a phosphorylation-independent manner by the testis-specific activator of CREM in testis (ACT). Previous studies demonstrated ACT as a nuclear protein in round and elongated spermatids coexpressed with CREM within the normal seminiferous epithelium.

The aim of the present study was to evaluate gene expression and localization of ACT transcripts in both normal and impaired spermatogenesis of man, cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), mouse and stallion and thereby uncover a possible association between an aberrant ACT expression and male infertility.

Applying RT-PCR and *in-situ* hybridization (ISH), we succeeded in demonstrating the cell- and stage-specific distribution of ACT-mRNA in testicular tissue. During normal spermatogenesis, RT-PCR resulted in an amplicon in man, monkey and mouse, which after sequencing could clearly be identified as ACT. ISH revealed ACT-mRNA in mid and late pachytene spermatocytes and in round spermatids in man, cynomolgus monkey, mouse and stallion. Among infertile men with round spermatid maturation arrest, only one patient showed a strong signal for ACT, while the other patients displayed only a weak signal with both RT-PCR and ISH. In addition, CREM knock-out mice known to be infertile due to round spermatid maturation arrest also exhibited only a weak amplification product for ACT. ACT-

mRNA was barely detectable in some round spermatids and was completely absent in pachytene spermatocytes.

These data indicate a role for CREM in ACT transcriptional regulation. The complete lack or decreased expression of ACT in patients with round spermatid maturation arrest suggests a vital role of ACT for the differentiation of round spermatids into fertile spermatozoa.



## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Arranz, V., Harper, F., Florentin, Y., Puvion, E., Kress, M., Ernoult-Lange, M. (1997) Human and mouse MOK2 proteins are associated with nuclear ribonucleoprotein components and bind specifically to RNA and DNA through their zinc finger domains. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2116-2126.
- Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C., Wyrobeck, A.J. (1984) DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell. Res.*, **150**, 298-308.
- Balhorn, R., Reed, S., Tanphaichitr, N. (1987) Aberrant protamine-1/protamine-2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*, **44**, 52-55.
- Bardin, C.W., Cheng, C.Y., Mustow, N.A., Gunsalus, G.L. (1988) The Sertoli Cell, in: Knobil, L., Neill, J.D. (Hrsg) The physiology of reproduction, Bd.1. *Raven Press, N.J.*, 933-974.
- Bedford, J.M., Bent, M.J., Calvin, H.J. (1973) Variation in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal spermatozoa. *Reprod. Fertil.*, **33**, 19-29.
- Behr, R., Weinbauer, G.F. (1999) Germ-cell specific cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response element modulator expression in rodent and primate testis is maintained despite gonadotropin deficiency. *Endocrinology*, **140**, 2476-2754.
- Behr, R., Weinbauer, G.F. (2000) CREM activator and repressor isoforms in human testis: sequence variations and inaccurate splicing during impaired spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, **6**, 967-972.
- Behr, R., Hunt, N., Ivell, R., Wessels, J., Weinbauer, G.F. (2000) Cloning and expression analysis of testis specific cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate-responsive element modulator activators in the nonhuman primate (*Macaca fascicularis*): Comparison with other primate and rodent species. *Biol. Reprod.*, **62**, 1344-1351.
- Behr, R., Weinbauer, G.F. (2001) cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? *Int. J. Androl.*, **24**, 126-135.
- Behre, H.M., Nieschlag, E., Meschede, P., Partsch, C.J. (1996) Störungen im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse. In: Nieschlag, E., Behre, H.M. (Hrsg) Andrologie-Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. *Springer-Verlag*, 121-138.

- Behre, H.M., Nieschlag, E. (1998) Endokrine Regulation der Hodenfunktion und endokrinologische Labordiagnostik. In: Krause, W., Weidner, W. (Hrsg) Andrologie-Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. *Enke-Verlag, Stuttgart*, 101-107.
- Behre, H.M., Nieschlag, E. (1998) Störungen des Endokrinen Systems. In: Krause, W., Weidner, W. (Hrsg) Andrologie-Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. *Enke-Verlag, Stuttgart*, 112-122.
- Belokopytova, I.A., Kostyleva, E.I., Tomilin, A.N., Vorob'ev, V.I. (1993) Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol. Reprod. Dev.*, **34**, 53-57.
- Bergmann, M., Kliesch, S. (1994) The distribution pattern of cytokeratin and vimentin immunoreactivity in testicular biopsies of infertile men. *Anat. Embryol.*, **190**, 515-520.
- Bergmann, M., Behre, H.M., Nieschlag, E. (1994) Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin. Endocrinol.*, **40**, 133-136.
- Bergmann, M., Kliesch, S. (1998) Hodenbiopsie. In: Krause, W., Weidner, W. (Hrsg) Andrologie-Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. *Enke-Verlag, Stuttgart*, 66-71.
- Bernstein, P., Ross, J. (1989) Poly(A)-Poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 373-377.
- Bernstein, P., Peltz, S.W., Ross, J. (1989) The Poly(A)-Poly(A) binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 659-670.
- Bianchi, P.G., Manicardi, G.C., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. (1993) Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in-situ nick translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **49**, 1083-1088.
- Biggiogera, M., Fakan, S., Leser, G., Martin, T.E., Gordon, J. (1990) Immunoelectron microscopical visualization of ribonucleoproteins in the chromatoid body of mouse spermatids. *Mol. Reprod. Dev.*, **26**, 150-158.
- Blanchard, Y., Lescoat, D., LeLannou, D. (1990) Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia*, **22**, 549-555.
- Blendy, J.A., Kaestner, K.H., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E., Schütz, G. (1996) Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature*, **380**, 162-165.
- Blöcher, S., Behr, R., Weinbauer, G.F., Bergmann, M., Steger, K. (2003) Different CREM-isoform gene expression between equine and human normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, **60**, 1357-1369.

- Böckers, T.M., Nieschlag, E., Kreutz, M.R., Bergmann, M. (1994) Localization of follicle-stimulating hormone (FSH) immunoreactivity and hormone receptor mRNA in testicular tissue of infertile men. *Cell Tissue Res*, **278**, 595-600.
- Braun, R.E., Peschon, J.J., Behringer, R.R., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1989) Protamine 3'untranslated sequence regulate temporal translational control of growth hormone in spermatids of transgenic mice. *Genes Dev.*, **3**, 793-802.
- Brindle, P., Linke, S., Montminy, M. (1993) Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature*, **364**, 821.
- Brinsko, S.P. (1996) GnRH therapy for subfertile stallions. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, **12**, 149-160.
- Bruning, G., Dierichs, R., Stümpel, C., Bergmann, M. (1993) Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia*, **25**, 311-316.
- Caldwell, K.A., Handel, M.A. (1991) Protamine transcript sharing among postmeiotic spermatids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 2407-2411.
- Cataldo, L., Mastrangelo, M.A., Kleene, K.C. (1999) A quantitative sucrose gradient analysis of the translational activity of 18 mRNA species in testes from adult mice. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 206-213.
- Chan, K.K., Tsui, S.K., Lee, S.M., Luk, S.C., Liew, C.C., Fung, K.P., Waye, M.M., Lee, C.Y. (1998) Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart. *Gene*, **210**, 345-350.
- Chevallier, P., Mauro, N., Feneux, D., Jouannet, P., David, G. (1987) Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *Lancet*, **2**, 806-807.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., Eddy, E.M. (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.*, **28**, 82-86.
- Chrivia, J.C., Kwoc, R.P.S., Lamb, N., Haniwawa, M., Montminy, M.R., Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**, 855-859.
- Clermont, Y. (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.*, **112**, 35-51.
- Cooke, H.J., Elliott, D.J. (1997) RNA-binding proteins and human male infertility. *Trends Genet.*, **13**, 87-90.

- Courtens, J.L., Loir, M. (1981) A cytochemical study of nuclear changes in boar, bull, goat, mouse, rat and stallion spermatids. *J. Ultrastruct Res.*, **74**, 327-340.
- Dadoune, J.P., Mayaux, M.J., Guihard-Moscato, M.L. (1988) Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by Aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, **20**, 211-217.
- Dadoune, J.P. (1995) The nuclear status of human sperm cells. *Micron*, **26**, 323-345.
- Daniel, P.B., Rohrbach, L., Habener, J.F. (2000) Novel cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) response element modulator isoform expressed by two newly identified cAMP-responsive promoters active in the testis. *Endocrinology*, **141**, 3923-3930.
- Dawid, I.B., Toyama, R., Taira, M. (1995) LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci.III*, **318**, 295-306.
- De Groot, R.P., den Hertog, J., Vandenheede, J.R., Goris, J., Sassone-Corsi, P. (1993) Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J.*, **12**, 3903-3911.
- De Cesare, D., Fimia, G.M., Sassone-Corsi, P. (1999) Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 281-285.
- De Cesare, D., Fimia, G.M., Sassone-Corsi, P. (2000) CREM, a master-switch of the transcriptional cascade in male germ cells. *J. Endocrinol. Invest.*, **23**, 592-596.
- De Cesare, D., and Sassone-Corsi, P. (2000) Transcriptional regulation by cAMP-responsive factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **64**, 343-369.
- De Cesare, D., Fimia, G.M., Brancorsini, S., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. (2003) Transcriptional control in male germ cells: general factor TFIIA participates in CREM-dependent gene activation. *Mol. Endocrinol.*, in print.
- De Kretzer, D.M., Kerr, J.B. (1988) The cytologie of the testis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Hrsg.) The physiology of reproduction, Bd.1. *Raven Press, N.J.*, 837-932.
- Delmas, V., Laoide, B., Masquillier, D., de Groot, R.P., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P. (1992) Alternative usage of initiation codons in CREM generates regulators with opposite functions. *Proc. Nat.I. Acad. Sci. USA*, **89**, 4226-4230.
- Delmas, V., van der Hoorn, F., Mellstrom, B., Jegou, B., Sassone-Corsi, P. (1993) Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1502-1514.
- Deng, W., Lin, H. (2002) Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell*, **2**, 819-830.

- DeYebra, L., Ballesca, J.L., Vanrell, J.A., Corzett, M., Balhorn, R., Oliva, R. (1998) Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fert. Steril.*, **69**, 755-759.
- Didier, D.K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M., Schwart, B.D. (1988) Characterisation of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Nat.I Acad. Sci. USA*, **85**, 7322-7326.
- Dietz, Huskamp (1999) Handbuch Pferdepraxis, *Enke Verlag*.
- Don, J., Stelzer, G. (2002) The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.*, **187**, 115-124.
- Douglas, R.H., Umphenour, N. (1992) Endocrine abnormalities and hormonal therapy. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, **8**, 237-249.
- Dynan, W.S., Tjian, R. (1985) Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature*, **316**, 774-778.
- Eddy, E.M., Welch, J.E., O'Brien, D.A. (1993) Gene expression during spermatogenesis. In: de Kretzer, D. (Hrsg.) Molecular biology of the male reproductive system. *Academic press, London*, 181-281.
- Elliott, D.J., Millar, M.R., Oghene, K. et al. (1997) Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc. Nat.I Acad. Sci. USA*, **94**, 3848-3853.
- Fajardo, M.A., Butner, K.A., Lee, K., Braun, R.E. (1994) Germ cell-specific proteins interact with the 3'untranslated regions of Prm-1 and Prm-2 mRNA. *Dev. Biol.*, **166**, 643-653.
- Ferreri, K., Gill, G., Montminy, M. (1994) The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc. Nat.I Acad. Sci. USA*, **91**, 1210-1213.
- Fimia, G.M., de Cesare, D., Sassone-Corsi, P. (1998) Mechanisms of activation by CREB and CREM: phosphorylation, CBP and a novel coactivator, ACT. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **63**, 631-642.
- Fimia, G.M., de Cesare, D., Sassone-Corsi, P. (1999) CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature*, **398**, 165-169.
- Fimia, G.M., de Cesare, D., Sassone-Corsi, P. (2000) A family of LIM-only transcriptional co-activators: Tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8613-8622.

- Foulkes, N.S., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P. (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell*, **64**, 739-749.
- Foulkes, N.S., Mellstrom, B., Benusiglio, E., Sassone-Corsi, P. (1992) Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature*, **355**, 80-84.
- Foulkes, N.S., Schlotter, F., Pevet, P., Sassone-Corsi, P. (1993) Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature*, **362**, 264-267.
- Franco, B., Guioli, S., Pragliola, A. et al. (1991) A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature*, **353**, 529-532.
- Gellersen, B., Kempf, R., Sandhowe, R., Weinbauer, G.F., Behr, R. (2002) Novel leader exons of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator (CREM) gene, transcribed from promoters P3 and P4, are highly testis-specific in primates. *Mol. Hum. Reprod.*, **8**, 965-976.
- Genini, M., Schwalbe, P., Scholl, F.A., Remppis, A., Mattei, M.G., Schafer, B.W. (1997) Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma. *DNA Cell. Biol.*, **16**, 433-442.
- Gonzales, G.A., Menzel, P., Leonard, J., Fischer, W.H., Montminy, M.R. (1991) Characterization of motifs which are critical for activity of the cAMP-responsive transcription factor CREB. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1306-1312.
- Gravance, C.G., Champion, Z., Liu, I.K., Casey, P.J. (1997) Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Anim. Reprod. Sci.*, **47**, 149-155.
- Gygax, A.P., Donawick, W.J., Gledhill, B.L. (1973) Haematocoele in a stallion and recovery of fertility following unilateral castration. *Equine Vet. J.*, **5**, 128-130.
- Hai, T.Y., Liu, F., Coukos, W.J., Green, M.R. (1989) Transcription factor ATF cDNA clones: An extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA binding heterodimers. *Genes Dev.*, **3**, 2083.
- Hecht, N.B. (1989a) Mammalian protamines and their expression. In: Hnilica, L., Stein, G., Stein, J. (Hrsg.) Histones and other basic proteins. *CRC Press, Boca Raton*, 347-373.
- Hecht, N.B. (1989b) The molecular biology of spermatogenesis: regulation of mammalian protamines from gene to proteins. In: Serio, M. (Hrsg.) Perspectives in Andrology. *Serono Symposia, Raven Press*, 25-35.

- Hecht, N.B. (1990a) Gene expression during spermiogenesis. In: Hamilton, D.W., Waites, G.M.H. (Hrsg.) Cellular and molecular events in spermiogenesis. *Cambridge University Press*, 265-283.
- Hecht, N.B. (1990b) Regulation of haploid expressed genes in male germ cells. *J. Reprod. Fertil.*, **88**, 679-693.
- Heideran, M.A., Kistler, W.S. (1987) Transcriptional and translational control of the message for transition protein 1, a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13309-13315.
- Heidaran, M.A., Kozak, C.A., Kistler, W.S. (1989) Nucleotide sequence of the Stp-1 gene coding for rat spermatid nuclear transition protein 1 (TPI): homology with protamine P1 and assignment of the mouse Stp-1 gene to chromosome 1. *Gene*, **75**, 39-46.
- Herbert, T.P., Hecht, N.B. (1999) The mouse Y-box protein, MSY2, is associated with a kinase on nonpolysomal mouse testicular mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1747-1753.
- Hummler, E., Cole, T.J., Blendy, J.A., Ganss, R., Guzzi, A., Schmid, W., Beermann, F., Schutz, G. (1994) Targeted mutation of the CREB gene: compensation with the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc. Natl. Sci. USA*, **91**, 5647-5651.
- Jensen, T.K., Carlsen, E., Jorgensen, N., Berthelsen, J.G., Keiding, N., Christensen, K., Petersen, J.H., Knudsen, L.B., Skakkebaek, N.E. (2002) Poor semen quality may contribute to recent decline in fertility rates. *Hum. Reprod.*, **17**, 1437-1440.
- Johnson, P.A., Peschon, J.J., Yelick, P.C., Palmiter, R.D., Hecht, N.B. (1988) Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes. *Biochem. Biophys. Acta*, **950**, 45-53.
- Johnsen, S.G. (1970) Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes, normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, **1**, 2-25.
- Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L. (1975) Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J. Cell Biol.*, **65**, 258-270.
- Kistler, M.K., Sassone-Corsi, P., Kistler, W.S. (1994) Identification of a functional cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the 5' flanking region of the gene for transition protein 1 (TP 1), a basic chromosomal protein of mammalian spermatids. *Biol. Reprod.*, **51**, 1322-1329.
- Kleene, K.C., Distel, R.J., Hecht, N.B. (1984) Translational regulation and coordinate deadenylation of a haploid mRNA during spermiogenesis in mouse. *Dev. Biol.*, **105**, 71-79.
- Kleene, K.C. (1989) Poly(A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis in the mouse. *Development*, **106**, 367-373.

- Kleene, K.C. (1993) Multiple controls over the efficiency of translation of the mRNAs encoding transition proteins, protamines, and the mitochondrial capsule selenoprotein in late spermatids in mice. *Dev. Biol.*, **159**, 720-731.
- Kleene, K.C., Smith, J. (1994) Translational activity of mouse protamine 1 messenger ribonucleoprotein particles in the reticulocyte and wheat germ cell-free translation systems. *Mol. Reprod. Dev.*, **37**, 12-20.
- Kleene, K.C. (1996) Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol. Reprod. Dev.*, **43**, 268-281.
- Kliesch, S., Penttilä, T.L., Gromoll, J., Saunders, P.T.K., Nieschlag, E., Parvinen, M. (1992) FSH receptor mRNA is expressed stagedependently during rat spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **84**, R45-R49.
- Kliesch, S., Behre, H.M., Hertle, L., Bergmann, M. (1997) Sertoli cell differentiation in the presence of carcinoma-in-situ and impaired spermatogenesis. *Int. J. Androl. [Suppl 1]*, **20**, 45.
- Knoll, J.H.M., Wagstaff, J., Lalande, M. (1993) Cytogenetic and molecular studies in Prader-Willi and Angelman syndromes: an overview. *Am. J. Med. Genet.*, **46**, 2-6.
- Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R., Goodman, R.H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, **370**, 223-226.
- Ladomery, M., Sommerville, J. (1994) Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5582-5589.
- Lalli, E., Lee, J.S., Lamas, M., Tamai, K., Zazapoulos, E., Nantel, F., Penna, L., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P. (1996) The nuclear response to cAMP: role of transcription factor CREM. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **351**, 201-209.
- Lamas, M., Monaco, L., Zazapopoulos, E., Lalli, E., Tamai, K., Penna, L., Mazzucchelli, C., Nantel, F., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P. (1996) CREM: a master-switch in the transcriptional response to cAMP. *Philos. Trans R Soc. Lond. 13 Biol. Sci.*, **351**, 561-567.
- Laoide, B.M., Foulkes, N.S., Schlotter, S., Sassone-Corsi, P. (1993) The functional versatility of CRFM is determined by its modular structure. *EMBO J.*, **12**, 1179-1191.
- Lee, K., Haugen, H.S., Clegg, C.H., Braun, R.E. (1995) Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 12451-12455.
- Lee, K., Fajardo, M.A., Braun, R.E. (1996) A testis cytoplasmic RNA-binding protein that has the properties of a translational repressor. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 3023-3034.



- Lee, S.M.Y., Tsui, S.K.W., Chan, K.K., Garcia-Barcelo, M., Waye, M.M.Y., Fung, K.P., Liew, C.C., Lee, C.Y. (1998) Chromosomal mapping, tissue distribution and cDNA sequence of four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1). *Gene*, **216**, 163-170.
- LeLannic, G., Arkhis, A., Vendrely, E. et al. (1993) Production, characterisation, and immunocytochemical applications of monoclonal antibodies to human sperm protamines. *Mol. Reprod. Dev.*, **36**, 106-112.
- Lescoat, D., Colleu, D., Boujard, D., LeLannou, D. (1988) Electrophoretic characteristics of nuclear proteins from human spermatozoa. *Arch. Androl.*, **20**, 35-40.
- Lescoat, D., Blanchard, Y., Lavault, M.T. et al. (1993) Ultrastructural and immunocytochemical study of P1 protamine localization in human testis. *Andrologia*, **25**, 93-99.
- Lin, W.W., Lamb, D.J., Lipshultz, L.I., Kim, E.D. (1998) Absence of cAMP-responsive element modulator expression at the spermatocyte arrest stage. *Fertil. Steril.*, **69**, 533-538.
- Lolis, D., Georgiou, I., Syrrou, M., Zikopoulos, K., Konstantelli, M., Messinis, I. (1996) Chromomycin A<sub>3</sub>-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *Int. J. Androl.*, **19**, 47-51.
- Lundblad, J.R., Kwok, R.P.S., Laurence, M.E., Harter, M.L., Goodman, R.H. (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, **374**, 85-88.
- Ma, K., Inglis, J.D., Sharkey, A. et al. (1993) A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell*, **75**, 1287-1295.
- Macho, B., Brancorsini, S., Fimia, G.M., Setou, M., Hirokawa, N., Sassone-Corsi, P. (2002) CREM-dependent transcription in male germ cells controlled by a kinesin. *Science*, **298**, 2388-2390.
- Martin-du-Pan, R.C., Campana, A. (1993) Physiopathology of spermatogenic arrest. *Fertil. Steril.*, **60**, 937-946.
- Martin-du-Pan, R.C., Bischof, P. (1995) Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum. Reprod.*, **10**, 1940-1950.
- Masquillier, D., Foulkes, N.S., Mattei, M.G., Sassone-Corsi, P. (1993) Human CREM gene: evolutionary conservation, chromosomal localization, and inducibility of the transcript. *Cell Growth Diff.*, **4**, 931-937.

- Mehta, M.K., Garde, S.V., Sheth, A.R. (1995) Occurrence of FSH, inhibin and other hypothalamic-pituitary-intestinal hormones in normal fertility, subfertility, and tumors of human testes. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.*, **40**, 39-46.
- Miettinen, M., Virtanen, I., Talerman, A. (1985) Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *Am. J. Pathol.*, **120**, 402-410.
- Miller, D. (1997) RNA in the ejaculate spermatozoa: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 669-676.
- Molina, C.A., Foulkes, N.S., Lalli, E., Sassone-Corsi, P. (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*, **75**, 875-886.
- Monaco, L., Nantel, F., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P. (1996) CREM: a transcriptional master switch governing the cAMP response in the testis, In: Hansson, V., Levy, F.O., Tasken, K. (Hrsg.) Signal transduction in testicular cells. *Springer Verlag, Berlin*, 69-94.
- Montminy, M. (1997) Transcriptional regulation by cAMP. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 807-822.
- Morales, C.R., Kwon, Y.K., Hecht, N.B. (1991) Cytoplasmic localization during storage and translation of the mRNAs of transition protein 1 and protamine 1, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis. *J. Cell. Sci.*, **100**, 119-131.
- Morales, C.R., Wu, X.Q., Hecht, N.B. (1998) The DNA/RNA-binding protein, TB-RBP, moves from the nucleus to the cytoplasm and through intercellular bridges in male germ cells. *Dev. Biol.*, **201**, 113-123.
- Morgan, M.J., Madgwick, A.J.A. (1996) Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 632-638.
- Morgan, M.J., Madgwick, A.J.A. (1999) The fourth member of the FHL family of LIM proteins is expressed exclusively in the testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 251-255.
- Morgan, M.J., Whawell, S.A. (2000) The structure of the human LIM protein ACT gene and its expression in tumor cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 776-783.
- Moussa, F., Oko, R., Hermo, L. (1990) The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat.
- Mülhardt, C. (2002) Molekularbiologie, Genomics. *Spektrum Verlag*.

- Nantel, F., Monaco, L., Foulkes, N.S., Masquilier, D., LeMeur, M., Henriksen, K., Dierich, A., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. (1996) Spermiogenesis deficiency and germ cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*, **380**, 159-162.
- Newton, C.R., Graham, A. (1994) PCR. *Spektrum Verlag*.
- Nieschlag, E. (1996) Nosologie andrologischer Krankheitsbilder. In: Nieschlag, E., Behre, H.M. (Hrsg) Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. *Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo*, 85-88.
- Nikolajczyk, B.S., Murray, M.T., Hecht, N.B. (1995) A mouse homologue of the *Xenopus* germ cell-specific ribonucleic acid / deoxyribonucleic acid-binding proteins p54/p56 interacts with the protamine 2 promoter. *Biol. Reprod.*, **52**, 524-530.
- Oakberg, E.F. (1956) Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.*, **99**, 507-515.
- Oliva, R., Dixon, G.H. (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol.*, **40**, 25-94.
- Palermo, I., Litrico, L., Emmanuele, G., Giuffrida, V., Sassone-Corsi, P., deCesare, D., Fimia, M.G., D'Agata, R., Calogero, A.E., Travali, S. (2001) Cloning and expression of activator of CREM in testis in human testicular tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 406-411.
- Paranko, J., Kallajoki, M., Pelliniemi, L.J., Lehto, V.P. Virtanen, I (1986) Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Dev. Biol.*, **117**, 35-44.
- Parlevliet, J.M. (1998) Clinical aspects of fertility in stallions. *Tijdschr Diergeneesk.*, **123**, 184-186.
- Pelletier, R.M., Friend, D.S. (1983) The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to filipin in the neonatal and adult guinea pig. *Am. J. Anat.*, **168**, 213-228.
- Penttilä, T.L., Yuan, L., Mali, P., Höög, C., Parvinen, M. (1995) Haploid gene expression: temporal onset and storage patterns of 13 novel transcripts during rat and mouse spermiogenesis. *Biol. Reprod.*, **53**, 499-510.
- Peri, A., Krausz, C., Cioppi, F., Granchi, S., Forti, G., Francavilla, S., Serio, M. (1998) cAMP-responsive element modulator gene expression in germ cells of normo- and oligozoospermic men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 3722-3726.
- Peri, A. und Serio, M. (2000) The CREM system in human spermatogenesis. *J. Endocrinol. Invest.*, **23**, 578-583.

- Prigent, Y., Müller, S., Dadoune, J.P. (1996) Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 929-935.
- Quinn, P.G. (1993) Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16999-17009.
- Reddy, P.M., Reddy, P.R. (1990) Differential regulation of DNA methylation in rat testis and its regulation by gonadotropin hormones. *J. Steroid. Biochem.*, **35**, 173-178.
- Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L.G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O., de la Chapelle, A., Silber, S., Page, D.C. (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet.*, **10**, 383-385.
- Robinson, W.P., Bottani, A., Xie, Y.G. et al. (1991) Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am. J. Hum. Gen.*, **49**, 1219-1224.
- Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., Hlanson, R.W. (1988) Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol. Chem.*, **263**, 9063-9066.
- Rogatsch, H., Jezek, D., Hittmair, A., Mikuz, G., Feichtinger, H. (1996) Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virch Arch*, **427**, 497-502.
- Roux, C., Mathieson, J. and Dadoune, J.P. (1987) Immunocytological distribution of HP1 group protamines in human testes and ejaculated spermatozoa. *Bull. Assoc. Anat. Nancy.*, **71**, 65-69.
- Roux, C., Gusse, M., Chevaillier, P. and Dadoune, J.P. (1988) An antiserum against protamines for immunohistochemical studies of histone to protamine transition during human spermiogenesis. *J. Reprod. Fertil.*, **82**, 35-42.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. (Hrsg.) Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press, Clearwater, Fl*, 1990.
- Sakkas, D., Umer, F., Bianchi, P.G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., Manicardi, G., Campana, A. (1996) Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, **11**, 837-843.
- Sanchez-Garcia, I., Rabbitts, T.H. (1994) The LIM-domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.*, **10**, 315-320.
- Sassone-Corsi, P. (1995) Transcription factors responsive to cAMP. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 355-377.

- Sassone-Corsi, P. (1998) Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**, 27-38.
- Sassone-Corsi, P. (2000) CREM: a master-switch regulating the balance between differentiation and apoptosis in male germ cells. *Mol. Reprod. And Develop.*, **56**, 228-229.
- Schmeichel, K.L., Beckerle, M.C. (1994) The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, **79**, 211-219.
- Schulze, W., Rheder, U. (1984) Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res.*, **237**, 395-407.
- Schuppe, H.C., Köhn, F.M., Haidl, G., Schill, W.B. (1999) Umwelteinflüsse auf die männliche Fertilität. *Reproduktionsmedizin*, **15**, 87-95.
- Siffroi, J.P., Alfonsi, M.F. and Dadoune, J.P. (1999) Co-localization of HP1 and TP1 transcripts in human spermatids by double electron microscopy in-situ hybridization. *Int. J. Androl.*, **22**, 83-90.
- Sigg, C. (1979) Klassifizierung tubulärer Hodenatrophien der Sterilitätsabklärung. Bedeutung der sog. bunten Atrophie. *Schweiz Med. Wochenschr.*, **109**, 1284-1293.
- Silber, S., van Steirteghem, A.C., Liu, J., Nagy, Z., Tournaye, H., Devroey, P. (1995) High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmatic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum. Reprod.*, **10**, 148-152.
- Silvestroni, L., Frajese, G., Fabrizio, M. (1976) Histones instead of protamines in terminal germ cells of infertile, oligospermic men. *Fertil. Steril.*, **27**, 1428-1437.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S. et al. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**, 240-244.
- Sommerville, J., Lodomery, M. (1996) Transcription and masking of mRNA in germ cells: involvement of Y-box proteins. *Chromosoma*, **104**, 469-478.
- Soosay, G.N., Bobrow, L., Happerfield, L., Parkinson, M.C. (1991) Morphology and immunohistochemistry of carcinoma in situ adjacent to testicular germ cell tumours in adults and children: implications for histogenesis. *Histopathol.*, **19**, 517-544.
- Steger, K., Rey, R., Kliesch, S., Louis, F., Schleicher, G., Bergmann, M. (1996) Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile men: a preliminary study. *Int. J. Androl.*, **19**, 122-128.
- Steger, K., Klonisch, T., Gavenis, K., Drabent, B., Doenecke, D., Bergmann, M. (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, **4**, 939-945.

- Steger, K. (1999a) Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat. Embryol.*, **199**, 471-487.
- Steger, K., Klonisch, T., Gavenis, K., Behr, R., Schaller, V., Drabent, B., Doenecke, D., Nieschlag, E., Bergmann, M., Weinbauer, G.F. (1999) Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round spermatid maturation arrest. *J. Androl.*, **20**, 747-754.
- Steger, K., Rey, R., Louis, F. et al. (1999b) Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum. Reprod.*, **14**, 136-143.
- Steger, K., Tetens, F., Bergmann, M. (1999c) Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem. Cell Biol.*, **112**, 215-220.
- Steger, K., Klonisch, T., Litzke, L.F., Bergmann, M. (2000a) Expression of mRNA of nucleoproteins during spermiogenesis of the stallion. *Reprod. Dom. Anim.*, **35**, 40.
- Steger, K., Pauls, K., Klonisch, T., Franke, F.E., Bergmann, M. (2000b) Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, **6**, 219-225.
- Steger, K. (2001a) Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Reprod.med.*, **17**, 137-148.
- Steger, K. (2001b) Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat. Embryol.*, **203**, 323-334.
- Steger, K., Failing, K., Klonisch, T., Behre, H.M., Manning, M., Weidner, W., Hertle, L., Bergmann, M., Kliesch, S. (2001c) Round spermatids from infertile men exhibit decreased levels of protamine-1 and -2 mRNA. *Hum. Reprod.*, **16**, 709-716.
- Steger, K., Failing, K., Fink, L., Bohle, R.M., Weidner, W., Bergmann, M., Kliesch, S. (2003) Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol. Hum. Reprod.*, **9**, 336-339.
- Steger, K., Klonisch, T., Brehm, R., Kretzer, K., Litzke, L.F., Bergmann, M. (2003) Expression of mRNA of nucleoproteins during spermiogenesis of the stallion. *Poster*.
- Stehle, J.H., Foulkes, N.S., Molina, C.A., Simonneaux, V., Pevet, P., Sassone-Corsi, P. (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, **365**, 314-320.
- Stern, L., Kleene, K.C., Gold, B., Hecht, N.B. (1983) Gene expression during mammalian spermatogenesis. III. Changes in populations of mRNA during spermiogenesis. *Exp. Cell Res.*, **143**, 247-255.
- Stosiek, P., Kasper, M., Karsten, U. (1990) Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation*, **43**, 66-70.

- Sun, Z., Means, A.R., Sassone-Corsi, P. (1995) Calspermin gene transcription is regulated by two cyclic AMP response elements contained in an alternative promoter in the calmodulin kinase IV gene. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 561-571.
- Takahara, H., Tsukahara, M., Baba, Y., Naito, K., Kajii, T. (1993) Dicentric Y chromosome in azoospermic males. *Br. J. Urol.*, **71**, 596-598.
- Tamai, K.T., Monaco, L., Nantel, F., Zazopoulos, E., Sassone-Corsi, P. (1997) Coupling signalling pathways to transcriptional control: nuclear factors responsive to cAMP. *Recent Prog. Horm. Res.*, **52**, 121-140.
- Tiepolo, L., Zuffardi, O. (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.*, **34**, 119-121.
- Uyttersprot, N., Miot, F. (1997) Dog CREM transcription factors: cloning, tissue distribution, and identification of new isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 74-78.
- Varner, D.D., Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Love, C.C., Taylor, T.S., Johnson, L. (2000) Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Anim. Reprod. Sci.*, **60-61**, 493-509.
- Vogt, P., Chandley, A.C., Hargraeve, T.B., Keil, R., Ma, K., Sharkey, A. (1992) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum. Genet.*, **89**, 491-496.
- Walker, W.H., Sanborn, B.M., Habener, J.F. (1994) An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 12423-12427.
- Walker, W.H., Habener, J.F. (1996) Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.*, **7**, 133-138.
- Weinbauer, G.F., Gromoll, J., Simoni, M., Nieschlag, E. (1996) Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag, E., Behre, H.M. (Hrsg) Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. *Springer-Verlag*, 27-61.
- Weinbauer, G.F., Behr, R., Bergmann, M., Nieschlag, E. (1998) Testicular cAMP-response element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Mol. Hum. Reprod.*, **4**, 9-15.
- Weinbauer, G.F., Nieschlag, E. (1999) Testicular physiology of primates. In: Weinbauer, G.F., Korte, R. (Hrsg.) Reproduction in nonhuman primates. *Waxmann-Verlag, Münster*, 13-26.

- WHO (1993) Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien/Zervixschleim-Interaktion. Übersetzung: Nieschlag, E., Bals-Pratsch, M., Behre, H.M., Knuth, U.A., Meschede, D., Nieschlag, S.. *Springer-Verlag*.
- Wistuba, J., Schlatt, S., Cantauw, C., von Schonfeldt, V., Nieschlag, E., Behr, R. (2002) Transplantation of wild-type spermatogonia leads to complete spermatogenesis in testes of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate response element modulator-deficient mice. *Biol. Reprod.*, **67**, 1052-1057.
- Wolffe, A.P. (1994) Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays*, **16**, 245-251.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., Sautiere, P. (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **80**, 117-128.
- Wu, J.Y., Ribar, T.J., Cummings, D.E., Burton, K.A., McKnight, G.S., Means, A.R. (2000) Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet.*, **25**, 448-452.
- Yaman, O., Ozdiler, E., Seckiner, I., Gogus, O. (1999) Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int. Urol. Nephrol.*, **31**, 519-523.
- Yiu, G.K., Hecht, N.B. (1997) Novel testis-specific protein-DNA interactions activate transcription of the mouse protamine 2 gene during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26926-26933.
- Zambrowicz, B.P., Harendza, C.J., Zimmermann, J.W., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1993) Analysis of the mouse protamine 1 promoter in transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 5071-5075.
- Zhang, D., Penttila, T.L., Morris, P.L., Roeder, R.G. (2001) Cell- and stage-specific high-level expression of TBP-related factor-2 (TRF2) during mouse spermatogenesis. *Mech. Dev.*, **106**, 203-205.
- Zhang, D., Penttila, T.L., Morris, P.L., Teichmann, M., Roeder, R.G. (2001) Spermiogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene. *Science*, **292**, 1153-1155.
- Zhong, J., Peters, A.H., Lee, K., Braun, R.E. (1999) A double-stranded RNA binding protein required for activation of repressed messages in mammalian germ cells. *Nat. Genet.*, **22**, 171-174.
- Zhou, Y., Sun, Z., Means, A.R., Sassone-Corsi, P., Bernstein, K.E. (1996) cAMP-response element modulator  $\tau$  is a positive regulator of testis angiotensin converting enzyme transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 12262-12266.



## Expression of activator of CREM in the testis (ACT) during normal and impaired spermatogenesis: correlation with CREM expression

Klaus Steger<sup>1,5</sup>, Rüdiger Behr<sup>2,3</sup>, Ingrid Kleiner<sup>1</sup>, Gerhard F. Weinbauer<sup>3,4</sup> and Martin Bergmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, University of Giessen, <sup>2</sup>Institute of Anatomy, Developmental Biology, University of Essen and <sup>3</sup>Institute of Reproductive Medicine, University of Muenster and <sup>4</sup>Covance Laboratories GmbH, Muenster, Germany

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed at: Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Frankfurter Strasse 98, 35392 Giessen, Germany. E-mail: Klaus.Steger@vetmed.uni-giessen.de

The cAMP-responsive element modulator (CREM) is involved in regulating gene expression in haploid spermatids. Transcriptional activity of the CREM protein is thought to be regulated by activator of CREM in the testis (ACT). Applying RT-PCR and *in situ* hybridization, cell-specific gene expression of ACT was demonstrated in man, cynomolgus monkey and mouse. During normal spermatogenesis, RT-PCR revealed a strong signal in all three species. We sequenced monkey ACT cDNA and demonstrated that the putative amino acid sequence is highly conserved between these species. *In situ* hybridization demonstrated ACT mRNA in mid and late pachytene spermatocytes and in round spermatids. Among four infertile men with round spermatid maturation arrest (RSMA), only one patient revealed a strong signal for ACT, while three patients displayed a weak signal for both RT-PCR and *in situ* hybridization, although germ cells normally expressing ACT were present in these patients. In addition, CREM knockout mice known to be infertile due to RSMA also exhibited only a weak amplification product for ACT cDNA. ACT mRNA was barely detectable in some round spermatids, but was completely absent in pachytene spermatocytes. Database search revealed two and one CRE within the putative human and mouse ACT promoters respectively. Our findings indicate a conserved function of ACT during the evolution of mammalian spermatogenesis and suggest a role for CREM in ACT transcriptional regulation.

**Key words:** ACT/human/monkey/mouse/spermatogenesis

### Introduction

Several spermatid-specific genes are known to contain a cAMP-responsive element (CRE) serving as binding site for the transcription factor cAMP-responsive element modulator (CREM) (Sassone-Corsi, 1995). CREM is essential for spermatogenesis, since male mice lacking a functional CREM gene are sterile due to round spermatid maturation arrest (Blendy *et al.*, 1996; Nantel *et al.*, 1996). Infertile men exhibiting round spermatid maturation arrest reveal a substantial reduction or a complete lack at the level of both CREM protein (Weinbauer *et al.*, 1998) and CREM mRNA (Steger *et al.*, 1999). Due to alternative transcriptional start sites, alternative transcript splicing, and alternative translational start sites, the CREM gene gives rise to functionally different proteins with either activating or repressing potential on target gene expression (reviewed in Daniel *et al.*, 2000; Behr and Weinbauer, 2001; Gellersen *et al.*, 2002). The presence of additional and inaccurately spliced CREM repressor isoforms has been reported in patients with impaired spermatogenesis (Behr and Weinbauer, 2000).

CREM was thought to be activated via phosphorylation of Ser-117 by protein kinase A (PKA) (Sassone-Corsi, 1995). Substitution of serine to alanine, however, has been demonstrated not to affect CREM activity in round spermatids implying that, at least in germ cells,

phosphorylation of Ser-117 is dispensable for CREM activation (Fimia *et al.*, 1999). In contrast to somatic cells, a phosphorylation-independent activation of CREM by activator of CREM in the testis (ACT) has been suggested (Fimia *et al.*, 1999). While Morgan and Whawell (2000) failed to detect transcripts of human ACT by northern blot analysis, Palermo *et al.* (2001) confirmed the presence of ACT mRNA in human testis by RT-PCR.

The present study investigates the expression and localization of ACT in normal and infertile testes.

### Materials and methods

#### Testicular tissue

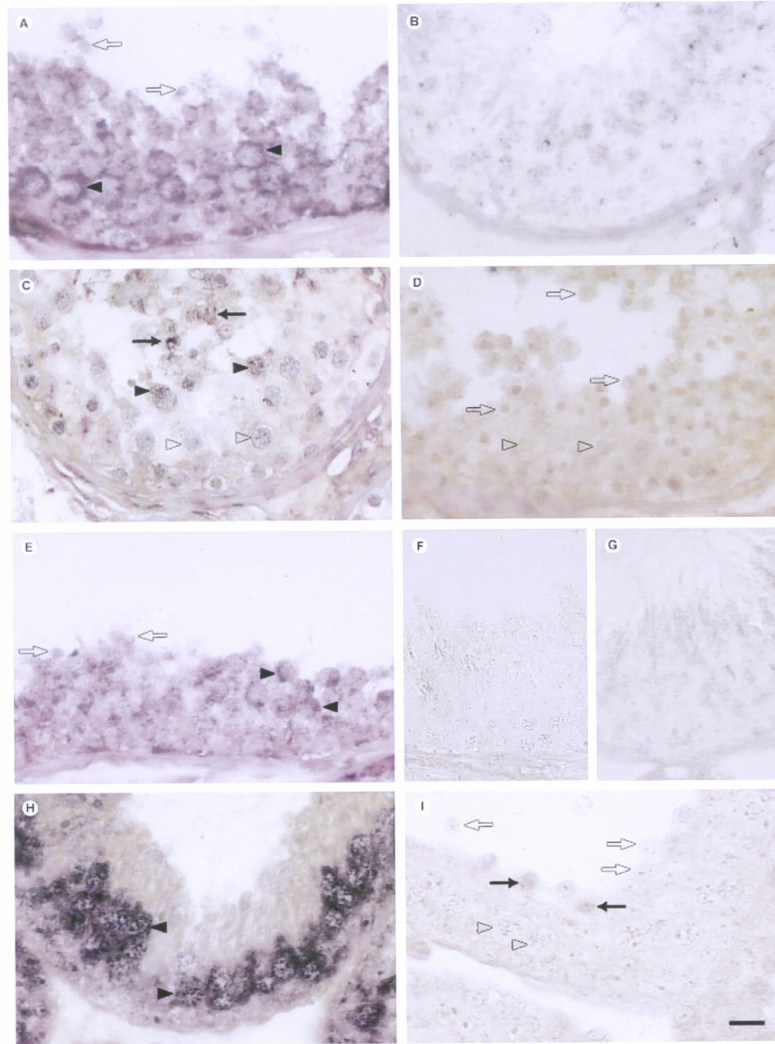
Ethical approval was granted by the ethics committee of the Justus-Liebig-University, Giessen, decision number 75/00. After written informed consent, testicular biopsies obtained from 14 infertile men, aged 22–44 years, were used. In 10 patients with obstructive azoospermia after vasectomy, biopsies were carried out for diagnostic reasons during vasectomy reversal. Histological evaluation revealed normal spermatogenesis. These samples served as normal controls. In four patients with non-obstructive azoospermia, biopsies were carried out for diagnostic reasons. Histological evaluation exhibited impaired spermatogenesis with complete lack of sperm due to a total arrest of spermatogenesis at the level of round spermatids. Monkey testes were available

from four adult and mature purpose-bred cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). All animals were healthy at the time of tissue collection. The age range of the animals was 5–10 years. Testes from mice ( $n = 4$ ) were obtained from a control group of an animal experiment which was carried out in accordance with the international guiding principles for biomedical research

First strand cDNA synthesis of 2  $\mu$ g RNA was performed using superscript II reverse transcriptase, according to the manufacturer's protocol (Promega, Germany).



# ACT gene expression during spermatogenesis



**Figure 3.** *In situ* hybridization showing expression of activator of CREM in the testis (ACT) mRNA in testes from man (A–D), monkey (E and F), and mouse (G–I). (B, F and G) Negative controls applying the sense probe. In men exhibiting normal spermatogenesis (A), primary spermatocytes of the mid and late pachytene stage reveal a strong signal for ACT mRNA. In men showing round spermatid maturation arrest, one patient (C, patient 1) revealed a weak signal for ACT mRNA in some pachytene spermatocytes and round spermatids, while three patients (D, patient 4) are totally devoid of ACT mRNA. In the cynomolgus monkey (E) and in the mouse (H), as in man, primary spermatocytes of the mid and late pachytene stage display a strong signal. In the CREM knockout mouse (I), only very weak signals can be demonstrated in some round spermatids, but not in pachytene spermatocytes. Black arrowheads: positive spermatocytes of the pachytene stage; white arrowheads: negative spermatocytes of the pachytene stage; black arrows: positive round spermatids; white arrows: negative round spermatids. Bar = 10 μm.

The 346 bp amplification product of the ACT gene (Accession XM\_004274) was generated using PCR with 5'-GAGTGGCAATTATTGTGTGCCATG-3' as forward primer (bp 438–461) and 5'-ACCCACCAAGGAGACAGAG-CATT-3' as reverse primer (bp 783–761). Four microlitres of cDNA were added to 5 μl 10×PCR-buffer II (including 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>), 1 μl dNTP

(5 mmol/l each), 1 μl of each primer (10 μmol/l), 0.5 μl polymerase (Promega), and DEPC-H<sub>2</sub>O to a final volume of 50 μl. PCR conditions were 1×94°C for 2 min, 40×94°C for 45 s, 58°C for 45 s, 72°C for 45 s, 1×72°C for 8 min.

As internal control, a 202 bp amplification product of the β-actin gene (Accession NM\_001101) was generated using PCR with 5'-CCTTCCTG-

GGCATGGAGTCCTG-3' as forward primer (bp 867–888) and 5'-GGAG-CAATGATCTTGATCTTC-3' as reverse primer (bp 1068–1048). All primers were purchased from MWG-Biotech (Germany).

#### Digoxigenin (DIG)-labelled cRNA probes

The 346 nt PCR product of the human ACT gene was subcloned in pGEM-T (Promega). Plasmids were transformed in the XL1-Blue *E. coli* strain

(Stratagene, Germany) and extracted by column purification (Qiagen, Germany). DNA-sequencing of the plasmid was performed by Qiagen. *In vitro* transcription of the DIG-labelled ACT cRNA was performed using the 10×RNA-DIG Labeling-Mix (Boehringer Mannheim, Germany) and RNA polymerases T3 and SP6. Vectors containing the ACT inserts were digested with NcoI and NotI (New England Biolabs, Germany) for the production of sense cRNA (NcoI) and antisense cRNA (NotI) respectively.

#### In situ hybridization

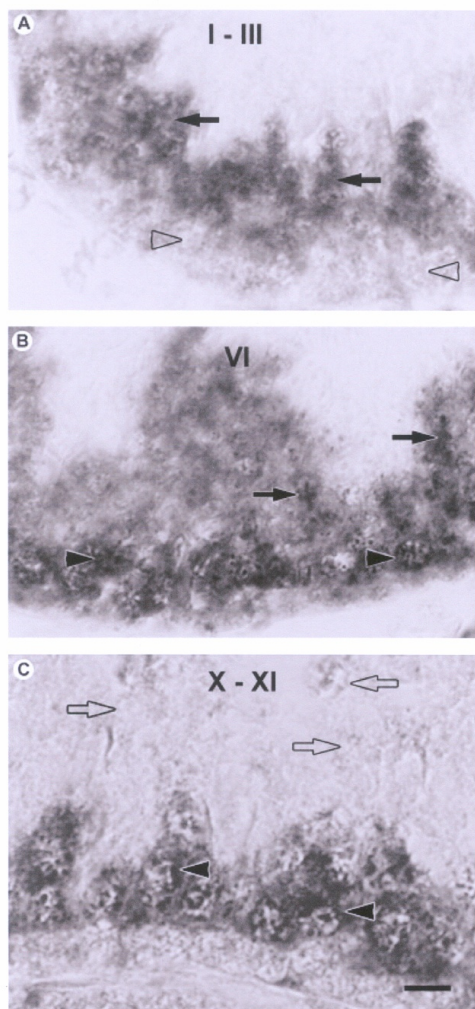
*In situ* hybridization was performed as described previously (Steger *et al.*, 1998). Briefly, 5 µm paraffin sections were dewaxed, partially digested with proteinase K, and postfixed in 4% paraformaldehyde. After prehybridization in 20% glycerol, sections were covered with the DIG-labelled sense or antisense cRNA probes. Both cRNA were used at a dilution of 1:100 in hybridization buffer containing 50% deionized formamide, 10% dextran sulphate, 2×standard saline citrate (SSC), 1×Denhardt's solution, 10 µg/ml salmon sperm DNA, and 10 µg/ml yeast t-RNA. Hybridization was performed overnight at 37°C in a humidified chamber containing 50% formamide in 2×SSC. Post-hybridization washes were performed, according to Lewis and Wells (1992). After blocking with 3% bovine serum albumin, sections were incubated with the anti-DIG Fab-antibody conjugated to alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim) overnight at 4°C. Staining was visualized by developing sections with nitroblue-tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate in a humidified chamber protected from light. For each test, negative controls were performed using DIG-labelled cRNA sense probes.

#### Results

In man, monkey and mouse, the ACT protein consists of 284 putative amino acids (Figure 1), indicating a high conservation of the tertiary structure of the protein. When human and mouse primary structure were compared, the identity was ~86% (243 out of 284 amino acids). By contrast, the putative amino acid sequence was almost completely conserved between man and monkey. Merely at two sites (positions 28 and 150), tyrosine residues (in one-letter-code Y) were replaced by structurally very similar phenylalanine residues (F) in monkey compared with man. In the mouse, there were tyrosines (Y) at positions 28 and 150 suggesting a rather late nucleotide exchange in evolution. Concerning the five LIM domains, it is the second one that is best conserved in the ACT protein.

In testes exhibiting normal spermatogenesis, RT-PCR revealed a 346 bp amplification product for man, cynomolgus monkey and mouse (Figure 2, lanes 1, 6 and 8). Among infertile men with round spermatid maturation arrest, the intensity of the PCR signals is heterogeneous (Figure 2, lanes 2–5). In mice lacking a functional CREM gene, ACT mRNA was almost undetectable by RT-PCR (Figure 2, lanes 9 and 10). Amplification of β-actin was used as internal standard displaying a constant signal at 202 bp. Negative controls without reverse transcriptase revealed no amplification products (Figure 2, lane 7).

Applying the ACT cRNA antisense probe, *in situ* hybridization in testes from man, cynomolgus monkey and mouse exhibiting normal spermatogenesis revealed a strong signal in primary spermatocytes of the mid and late pachytene stage and in round spermatids (Figure 3A, E and H, Figure 4, Figure 5). In man (Figure 5 A), ACT mRNA resulted in strong signals in pachytene spermatocytes (stages I–VI) and weak signals in step 1 and 2 round spermatids (stages I and II). In the cynomolgus monkey (Figure 5B), ACT mRNA was present in pachytene spermatocytes from stage V to stage XII and in step 1–7 round spermatids (stages I–VII). In the mouse (Figure 4, Figure 5C), ACT mRNA could be demonstrated in pachytene spermatocytes from stage V to stage XII and in step 1–8 round spermatids (stages I–VIII). Negative controls involving the ACT cRNA sense probe resulted in no signals (Figure 3B, F and G). In men with round spermatid maturation arrest, only a small number of round spermatids was present within the seminiferous tubules and many of these cells were multinucleated,



**Figure 4.** *In situ* hybridization showing expression of activator of CREM in the testis (ACT) mRNA in testes from mouse at stages I–III (A), VI (B) and (X/XI) of the seminiferous epithelial cycle. Stages I–IV exhibit positive signals only for round spermatids. Both pachytene spermatocytes and round spermatids are positive during stages V–VIII. Stages IX–XII reveal positive signals only for pachytene spermatocytes. Black arrowheads: positive spermatocytes of the pachytene stage; white arrowheads: negative spermatocytes of the pachytene stage; black arrows: positive round spermatids; white arrows: negative round spermatids. Roman numbers represent the stage of the seminiferous epithelial cycle (see Figure 5). Bar = 10 µm.

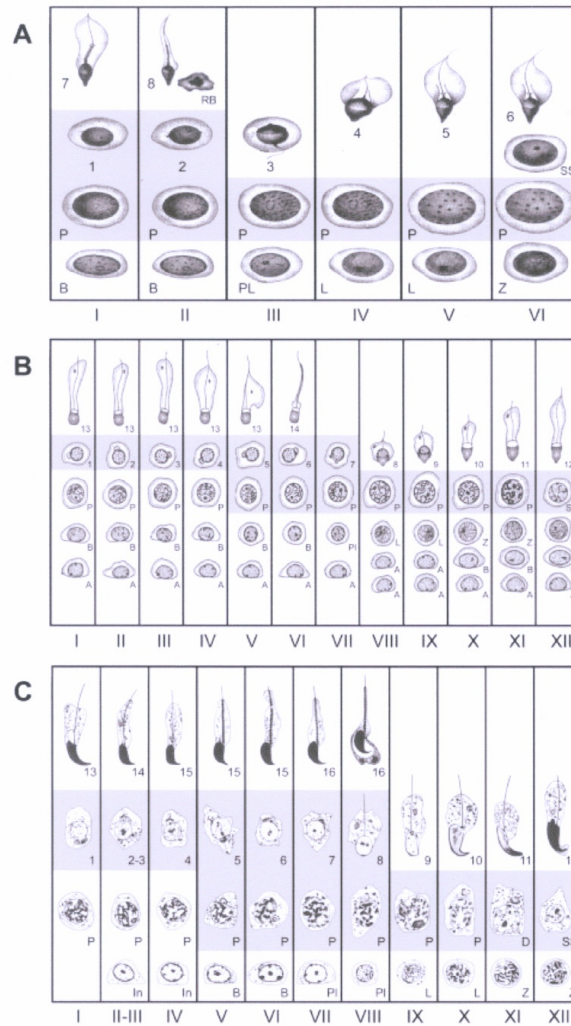


# ACT gene expression during spermatogenesis

whereas spermatocytes, which normally express ACT mRNA, were present in these samples in significant number. However, expression of ACT mRNA was either drastically reduced (Figure 3C) or completely absent (Figure 3D). This heterogeneous expression pattern in patients with round spermatid maturation arrest is in keeping with data obtained by RT-PCR (Figure 2, lanes 2–5). In mice lacking

a functional CREM gene, only a few round spermatids, but no pachytene spermatocytes, revealed a very weak signal for ACT mRNA compared with the wild-type control testis (Figure 3I and H).

When analysing the putative promoter region of the human and mouse ACT gene, we found two CRE in the human 5'-flanking region



**Figure 5.** Schematic representation of the seminiferous epithelial cycle of man (A), cynomolgus monkey (B) and mouse (C) showing the expression of activator of CREM in the testis (ACT) mRNA (grey background) during normal spermatogenesis. Roman numbers represent the stage of the seminiferous epithelial cycle. A-type spermatogonia = A; intermediate-type spermatogonia = In; B-type spermatogonia = B; primary spermatocytes of the preleptotene stage = PL, leptotene stage = L, zygotene stage = Z, and pachytene stage = P; secondary spermatocytes = SS. Arabic numbers represent the step of spermiogenesis. RB = Residual body. (A) Modified from Clermont (1963). (B) Modified from Behr and Weinbauer (1999). (C) Modified from Russell *et al.* (1990).

at positions -31 and -62 (relative to the putative start of transcription, which was designated +1) and one in the mouse 5'-flanking region at position -41 (Figure 6).

## Discussion

ACT has been reported to represent a phosphorylation-independent and, thus, new pathway for transcriptional activation by CREM in germ cells (Fimia *et al.*, 1999). It has been demonstrated that it is the third LIM domain which interacts with the kinase-inducible domain of CREM. However, as has been shown in the present study, not the third but the second LIM domain is the best conserved domain during mammalian evolution. This suggests that the second domain serves as an important interface for the interaction of ACT with other proteins of the transcriptional machinery in germ cells. Since ACT is germ cell-specific, it is tempting to speculate that the second LIM domain of ACT may interact with other germ cell-specific transcription factors, such as TRF2 (Zhang *et al.*, 2001a,b).

ACT is absent or at least drastically reduced in mice lacking a functional CREM gene and in men with round spermatid maturation arrest, in which CREM has been demonstrated to be only barely detectable or completely absent (Steger *et al.*, 1999). This suggests that CREM plays an important role in ACT transcriptional regulation. The presence of the well-conserved CRE in the putative ACT promoter regions of mouse and man, in addition, suggests a direct effect of CREM on ACT transcriptional regulation. However, it does not answer the question how CREM can regulate the ACT promoter, if CREM-dependent transcriptional activation in germ cells itself depends on ACT as a co-factor. Nevertheless, our data provide evidence that CREM represents an essential factor for ACT expression and highlights the role of CREM as a key regulator of spermiogenesis.

In the present study, ACT cDNA was amplified from human testis homogenates, corroborating data from Palermo *et al.* (2001). In addition, ACT mRNA was localized to pachytene spermatocytes (stages I–VI) and step 1 and 2 round spermatids applying *in situ* hybridization. CREM mRNA has been demonstrated in pachytene spermatocytes (stages IV–VI) and step 1–3 round spermatids (Steger *et al.*, 1999), while the CREM protein was reported to be present only in step 1–3 round spermatids (Weinbauer *et al.*, 1998; Steger *et al.*, 1999).

In the cynomolgus monkey, CREM protein has been reported to be present in step 3–7 round spermatids (Behr and Weinbauer, 1999). In the present study, ACT mRNA has been demonstrated in pachytene spermatocytes (stages V–XII) and in step 1–7 round spermatids,

suggesting an interaction between CREM and ACT in this preclinical animal model.

In the mouse, both CREM mRNA and CREM protein is present in pachytene spermatocytes and round spermatids (Delmas *et al.*, 1993; Behr and Weinbauer, 1999, 2001). Transcripts of ACT were demonstrated in pachytene spermatocytes (stages V–XII) and step 1–8 round spermatids (this study). The corresponding protein has been reported to be solely present in round spermatids, exhibiting a nuclear signal in step 1–7 spermatids and a cytoplasmic signal in step 8–10 spermatids (Fimia *et al.*, 1999; Macho *et al.*, 2002), suggesting a temporal uncoupling of transcription and translation.

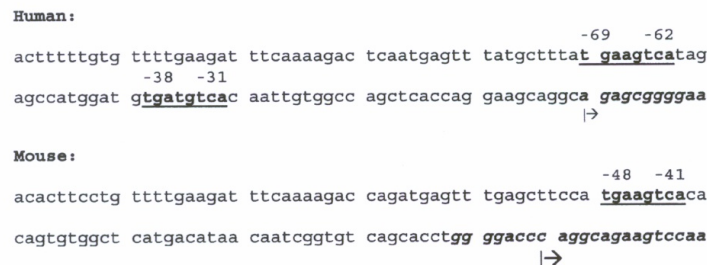
Infertile men with round spermatid maturation arrest revealed a heterogeneous ACT mRNA expression. ACT mRNA is absent in pachytene spermatocytes and in most round spermatids where ACT is normally expressed, although these cells are present. Applying RT-PCR, one patient revealed a strong amplification product for ACT cDNA, while three other patients displayed only a weak signal. These results correspond with data obtained by *in situ* hybridization (this study) and data from Steger *et al.* (1999). In the latter study, CREM has been demonstrated to be only barely detectable or completely absent in men with round spermatid maturation arrest. In addition, Behr and Weinbauer (2000) reported the presence of additional, unusual and inaccurately spliced CREM transcripts in patients with impaired spermatogenesis.

Male mice lacking a functional CREM gene have been demonstrated to be infertile due to round spermatid maturation arrest (Blendy *et al.*, 1996; Nantel *et al.*, 1996). In the present study, as in infertile men exhibiting round spermatid maturation arrest, CREM knockout mice have also been demonstrated to exhibit only a weak signal for ACT cDNA. *In situ* hybridization, in addition, revealed weak staining in some round spermatids, but no staining in pachytene spermatocytes, suggesting a delayed and/or incomplete expression of the ACT gene resulting in a block of spermatid differentiation followed by infertility.

Both the stage- and cell-specific gene expression of ACT during normal spermatogenesis of various species and alterations of these expression patterns in men with impaired spermatogenesis and CREM-deficient mice will contribute to our understanding of the complex regulation of CREM-dependent gene expression in haploid spermatids. In conclusion, our observations point to a key role of ACT in primate and rodent spermatogenesis and suggest that testicular CREM can regulate ACT expression.

## Acknowledgements

We are grateful to Prof. Dr W. Weidner, Urological Clinic of the University, Giessen, and Dr S. Kliesch, Urological Clinic of the University, Muenster, for providing the human testicular biopsies, as well as Prof. Dr E. Nieschlag,



**Figure 6.** Search for CRE in the putative human and mouse proximal promoter regions. The putative start sites of transcription of the activator of CREM in the testis (ACT) genes are indicated by bold italic characters and the arrow. The tandem and the single CRE in the human and mouse promoter sequence respectively are denoted by bold and underlined characters.



Institute of Reproductive Medicine of the University, Muenster, for providing the testes of the CREM knockout mice. The skilful technical assistance of J.Dern-Wieloch, G.Erhardt, A.Hax, A.Hild, I.Kromberg and R.Sandhowe is gratefully acknowledged. Funding of this research programme was provided by DFG grants STE 892/1-3 and BE 2296/4-1.

## References

- Behr R and Weinbauer GF (1999) Germ-cell specific cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response element modulator expression in rodent and primate testis is maintained despite gonadotropin deficiency. *Endocrinology* 140,2476-2754.
- Behr R and Weinbauer GF (2000) CREM activator and repressor isoforms in human testis: sequence variations and inaccurate splicing during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 6,967-972.
- Behr R and Weinbauer GF (2001) cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? *Int J Androl* 24,126-135.
- Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E and Schütz G (1996) Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 380,162-165.
- Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112,35-51.
- Daniel PB, Rohrbach L and Habener JF (2000) Novel cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) response element modulator  $\Theta$  isoform expressed by two newly identified cAMP-responsive promoters active in the testis. *Endocrinology* 141,3923-3930.
- Delmas V, van der Hoorn F, Mellstrom B, Jegou B and Sassone-Corsi P (1993) Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol Endocrinol* 7,1502-1515.
- Fimia GM, de Cesare D and Sassone-Corsi P (1999) CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* 398,165-169.
- Gellersen B, Kempf R, Sandhowe R, Weinbauer GF and Behr R (2002) Novel leader exons of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator (CREM) gene, transcribed from promoters P3 and P4, are highly testis-specific in primates. *Mol Hum Reprod* 8,965-976.
- Lewis FA and Wells M (1992) Detection of virus in infected human tissue by in-situ hybridization. In Wilkinson DG (ed) *In-Situ Hybridization, A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp 121-135.
- Macho B, Brancorsini S, Fimia GM, Setou M, Hirokawa N and Sassone-Corsi P (2002) CREM-dependent transcription in male germ cells controlled by a kinesin. *Science* 298,2388-2390.
- Morgan MJ and Whawell SA (2000) The structure of the human LIM protein ACT gene and its expression in tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 5,776-783.
- Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M and Sassone-Corsi P (1996) Spermiogenesis deficiency and germ cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 380,159-162.
- Palermo I, Litrico L, Emmanuele G, Giuffrida V, Sassone-Corsi P, deCesare D, Fimia MG, D'Agata R, Calogero AE and Travalì S (2001) Cloning and expression of activator of CREM in testis in human testicular tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 4,406-411.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha-Hikim AP and Clegg ED (eds) (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, FL.
- Sassone-Corsi P (1995) Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11,355-377.
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D and Bergmann M (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 4,939-945.
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Behr R, Schaller V, Drabent B, Doenecke D, Nieschlag E, Bergmann M and Weinbauer GF (1999) Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round spermatid maturation arrest. *J Androl* 20,747-754.
- Weinbauer GF, Behr R, Bergmann M, Nieschlag E (1998) Testicular cAMP-response element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Mol Hum Reprod* 4,9-15.
- Wistuba J, Schlatt S, Cantauw C, von Schonfeldt V, Nieschlag E and Behr R (2002) Transplantation of wild-type spermatogonia leads to complete spermatogenesis in testes of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate response element modulator-deficient mice. *Biol Reprod* 67,1052-1057.
- Zhang D, Penttilä TL, Morris PL and Roeder RG (2001a) Cell- and stage-specific high-level expression of TBP-related factor-2 (TRF2) during mouse spermatogenesis. *Mech Dev* 106,203-205.
- Zhang D, Penttilä TL, Morris PL, Teichmann M and Roeder RG (2001b) Spermiogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene. *Science* 292,1153-1155.

Submitted on September 26, 2003; accepted on October 7, 2003

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABP	androgenbindendes Protein
abs.	absolut
ACT	Activator of CREM in testis
AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	einfach destilliertes Wasser
ATF-1	Activating transcription factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
bZIP	basic domain/ leucin zipper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-binding protein
cDNA	copy DNA
CRE	cAMP-responsive-element
CREB	cAMP-responsive-element-binding
CREM	cAMP-responsive-element-modulator
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA (DNS)	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
gER	glattes endoplasmatisches Retikulum



GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
°C	Grad Celsius
h	Stunde
hnRNA	high nuclear RNA
H1t	hodenspezifisches Histon H1
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICER	inducible cAMP early repressor
ISH	<i>in-situ</i> Hybridisierung
LH	Luteinisierendes Hormon
LMO	LIM-only Protein
M	Molar
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
mRNA	Boten (messenger) – RNA
mRNP-Partikel	messenger RiboNucleoProtein-Partikel
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NTP	Nuklotidtriphosphat
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
OT	Objektträger
PABP	poly-A-binding-protein
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Methode
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PKA	Proteinkinase A
Prm	Protamin
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA (RNS)	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s.o.	siehe oben
TAE	Tris-Acetat+EDTA
TAF	TATA-box-binding protein-associated Factor
TBP	TATA-box-binding protein
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tnp	Transitionsprotein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
UTR	untranslated region
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Steger danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung, welche mir die zügige Fertigstellung meiner Dissertation ermöglicht hat.

Bei Frau Anne Hild und Frau Jutta Dern-Wieloch sowie den anderen Mitarbeitern des Instituts für Veterinäranatomie, Histologie und Embryologie möchte ich mich für die labortechnische Betreuung und Unterstützung sowie für die freundliche Zusammenarbeit herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Weinbauer möchte ich für die Bereitstellung des Hodengewebes von *Macaca fascicularis* und Herrn Dr. Behr für die Durchführung der ACT-Sequenzierung beim Affen danken.

Herrn Prof. Dr. Nieschlag danke ich für die Bereitstellung der Hoden zweier CREM knock-out Mäuse und Herrn Prof. Dr. Litzke für das Überlassen zweier Hoden vom Pferd.

Herrn R. Blakey danke ich sehr für seine Hilfe, diese Dissertation zu erlangen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater, Peter Kleiner, für seine geduldige Unterstützung in computertechnischen Fragen und seine unendliche Mühe mir in perfektionistischer Kleinarbeit bei der Erstellung von Bildern und Grafiken zu helfen, sowie meiner Mutter, Edelgard Kleiner, die uns verköstigte und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgte.

Danke auch an meinen Mann Kai für seine Geduld, Unterstützung und all die aufmunternden Worte, die stets zur Weiterarbeit animierten.

Vielen Dank an Herrn Dr. Kessler, Herrn Dr. Kosfeld und Herrn Dr. Tassani-Prell der Tierklinik Hofheim, die mich zum raschen Abschluß der Dissertation motivierten.

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5063-0



9 783835 950634